



**Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular**

**NUEVA ESTRATEGIA BASADA EN LA UTILIZACIÓN DE
APTÁMEROS COMO ANTIVIRALES CONTRA EL VIRUS
DE LA GRIPE Y ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE
CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA VIRAL**

**TESIS DOCTORAL
PALOMA RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ
Julio, 2016**



**Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular**

**NUEVA ESTRATEGIA BASADA EN LA UTILIZACIÓN DE
APTÁMEROS COMO ANTIVIRALES CONTRA EL VIRUS
DE LA GRIPE Y ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE
CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA VIRAL**

**Memoria presentada por Paloma Rodríguez Rodríguez
para optar al grado de Doctor en Ciencias
por la Universidad Autónoma de Madrid
Madrid, Julio 2016**



El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), bajo la dirección de la Dra. Amelia Nieto Martín y la Dra. M^a Elena Martín Palma. La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al disfrute de una beca predoctoral de la Junta para la Ampliación de estudios (JAE) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

A Pedro

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	13
SUMMARY.....	23
INTRODUCCIÓN.....	27
EL VIRUS DE LA GRIPE.....	29
1. INTRODUCCIÓN Y GENERALIDADES.....	29
2. LA PARTÍCULA VIRAL.....	30
2.1. Proteínas virales.....	30
2.2. Organización genómica y RNAs virales sintetizados en la célula infectada.....	33
2.3. La RNP viral.....	35
3. EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE.....	37
3.1. Adsorción y entrada de las partículas virales.....	37
3.2. Transcripción, replicación y expresión génica.....	37
3.3. Ensamblaje y liberación de los viriones.....	41
LAS REGIONES NO TRADUCIDAS DEL GENOMA VIRAL.....	42
1. LA REGIÓN COMÚN A TODOS LOS SEGMENTOS: EL PROMOTOR VIRAL.....	43
1.1. Estructura de la región promotora del vRNA.....	43
1.2. Función de los nucleótidos de la región promotora del vRNA.....	45
2. LA SEÑAL DE POLIADENILACIÓN.....	45
3. LA REGIÓN ESPECÍFICA DE SEGMENTO.....	46
3.1. Conservación de la región específica de segmento del vRNA	46
3.2. Función de la región específica de segmento del vRNA.....	46
UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA EL CONTROL EFICAZ DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE.....	48
1. ANTIVIRALES DISPONIBLES CONTRA EL VIRUS DE LA GRIPE.....	49
2. APTÁMEROS: UNA NUEVA HERRAMIENTA TERAPEÚTICA.....	49
3. LA TRADUCCION DE LOS mRNAs VIRALES COMO POSIBLE DIANA ANTIVIRAL.....	50
3.1. La traducción de proteínas en eucariotas.....	51

3.2. La traducción de proteínas en el virus de la gripe.....	51
OBJETIVOS.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
MATERIALES.....	65
1. LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS.....	65
2. CEPAS BACTERIANAS	65
3. CEPAS VIRALES.....	65
4. PLÁSMIDOS.....	65
4.1. Plásmidos para la reconstitución de RNPs virales.....	65
4.2. Plásmidos para el rescate de virus recombinantes.....	65
4.3. Otros plásmidos.....	66
5. ANTICUERPOS.....	66
6. APTÁMEROS	67
5. OTROS REACTIVOS.....	67
MÉTODOS.....	69
1. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	69
1.1. Construcción de los plásmidos con mutaciones puntuales en el plásmido pHH-NS- CAT.....	69
1.2. Construcción de los plásmidos con mutaciones puntuales en el plásmido pPOLI-NS para el rescate de virus recombinantes.....	69
1.3. Aislamiento del RNA total de la célula.....	70
1.4. RT-qPCR para la detección y cuantificación de mRNAs y vRNAs virales.....	70
1.5. Extension de cebador (" <i>Primer Extension</i> ") para la detección y cuantificación del RNA de las RNPs virales.....	72
1.6. Purificación de RNA de virus presentes en sobrenadantes.....	73
1.7. Análisis de los niveles intracelulares de los aptámeros por qPCR.....	74
2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	74
2.1. Inmunodetección de proteínas (<i>Western- Blot</i>)	74
2.2. Purificación de GST-hPABP1.....	75

2.3.	Efecto de los aptámeros en la unión de hPABP1 a secuencias poli (A)	76
2.4.	Ensayos de traducción <i>in vitro</i>	76
2.5.	Ensayos de transcripción/traducción <i>in vitro</i>	77
2.6.	Estudios de afinidad mediante <i>Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay</i> (ELONA)..	77
2.7.	Mapeo de la zona de interacción entre hPABP1 y los aptámeros.....	78
2.8.	Marcaje metabólico in vivo de proteínas celulares y virales.....	79
2.9.	Ensayo de traducción in vivo en células HEK293T.....	79
2.10.	Determinación de la cantidad de proteína CAT mediante <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (E.L.I.S.A.)	80
2.11.	Inmunofluorescencias.....	80
2.12.	Inmunoprecipitación de eIF4GI y de hPABP1.....	80
3.	MANIPLUACIÓN DE CULTIVOS CELULARES.....	81
3.1.	Mantenimiento de cultivos celulares.....	81
3.2.	Transfección de células humanas.....	81
3.3.	Reconstitución de RNPs virales.....	82
3.4.	Ensayos de viabilidad celular.....	82
4.	TÉCNICAS VIROLÓGICAS.....	83
4.1.	Infecciones por virus de la gripe.....	83
4.2.	Generación de stocks de virus.....	83
4.3.	Titulación de virus mediante ensayo de placa.....	85
4.4.	Rescate de virus recombinantes.....	84
4.5.	Curvas de crecimiento.....	84
	RESULTADOS	87
	BÚSQUEDA DE UN ANTIVIRAL EFECTIVO PARA CONTROLAR LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE	89
1.	CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DE APTÁMEROS QUE RECONOCEN LA PABP1 DE <i>Leishmania infantum</i>	89
1.1.	Los aptámeros seleccionados contra la LiPABP1, reconocen la hPABP1.....	90
1.2.	ApPABP11 inhibe la unión de la proteína hPABP1 a poli(A)+	90
1.3.	Efecto de los aptámeros sobre diferentes sistemas de traducción <i>in vitro</i>	91
1.4.	Efecto sobre la traducción de proteínas celulares <i>in vivo</i>	94

1.5.	Estudio de afinidad de los aptámeros con la proteína hPABP1.....	95
1.6.	Caracterización del sitio de unión de los aptámeros a la proteína hPABP1.....	96
2.	CARACTERIZACIÓN IN VIVO DE APTÁMEROS QUE RECONOCEN LA PROTEINA hPABP1.....	97
2.1.	Búsqueda de las condiciones experimentales adecuadas.....	98
2.2.	Estudio del efecto de los aptámeros sobre la traducción de proteínas celulares y toxicidad celular.....	102
2.3.	Estudio del efecto de los aptámeros sobre la traducción de proteínas virales y cálculo de la efectividad de los mismos.....	103
2.4.	Determinación de las dosis de trabajo.....	106
2.5.	Efecto de los aptámeros en infecciones de ciclo único.....	106
2.6.	Efecto de los aptámeros sobre múltiples ciclos de infección.....	110
2.7.	Estudio del mecanismo de acción de los aptámeros	112
	CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA REGIÓN ESPECÍFICA DE SEGMENTO DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA GRIPE.....	115
1.	CARACTERIZACIÓN IN VITRO DE LA REGIÓN ESPECÍFICA DE SEGMENTO.....	116
1.1.	Estudio de homología de secuencias.....	116
1.2.	Estructuras de la región no codificante del segmento NS.....	117
1.3.	Generación de mutantes puntuales en el segmento NS.....	120
1.4.	Efecto de las modificaciones introducidas en la región específica de segmento sobre la actividad transcriptiva-replicativa de la polimerasa viral.....	121
1.5.	Efecto de las mutaciones en un contexto próximo a la infección.....	124
2.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES, EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE.....	125
2.1.	Recate de virus en el entorno de PR8.....	126
2.2.	Cinéticas de crecimiento a alta multiplicidad de infección.....	126
2.3.	Cinéticas a baja multiplicidad de infección.....	131
	DISCUSIÓN.....	133
	BÚSQUEDA DE UN ANTIVIRAL EFECTIVO CONTRA EL VIRUS DE LA GRIPE.....	135
1.	ANTIVIRALES EN FASE DE DESARROLLO CLÍNICO.....	136
2.	APTÁMEROS COMO HERRAMIENTA ANTIVIRAL.....	136
2.1.	Aptámeros contra el virus de la gripe.....	137
3.	MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS APTÁMEROS ApPABP7 Y ApPABP11.....	138

3.1.	Los sitios de unión de ApPABP7 y ApPABP11 a la proteína hPABP1 están muy próximos, pero son diferentes.....	138
3.2.	hPABP1 se localiza asociada a la cola de poli(A) de los mRNAs virales y a la subunidad PB2 de la polimerasa viral.....	139
3.3.	Los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11 inhiben la interacción eIF4GI-PB2.....	140
4.	EL ApPABP7, UN ANTIVIRAL PROMETEDOR.....	140
	ESTUDIO DE LAS REGIÓN ESPECÍFICA DE SEGMENTO DEL VIRUS DE LA GRIPE.....	143
1.	FUNCIONES DE LA PROTEÍNA VIRAL NS1.....	143
1.1.	Control de la maquinaria de defensa celular.....	144
1.2.	Participación en la morfogénesis viral.....	144
1.3.	Inhibición del procesamiento y el transporte de los mRNAs celulares.....	144
1.4.	Modulación de la actividad de la polimerasa viral.....	144
1.5.	Modulación del proceso de <i>splicing</i> de los mRNAs virales.....	145
1.6.	Estimulación de la traducibilidad de los mRNAs virales.....	145
2.	FUNCIONES DE LA PROTEÍNA VIRAL NEP.....	145
2.1.	Regulación de los procesos de transcripción y replicación del RNA viral.....	145
2.2.	Salida de las RNPs progenie al citoplasma.....	146
3.	LOS VIRUS NS15A Y NS15G POSEEN UNA CINÉTICA DE INFECCIÓN RETRASADA Y UNA RETENCIÓN NUCLEAR DE PROTEÍNAS VIRALES.....	146
3.1.	La funcionalidad de la polimerasa viral permanece intacta.....	146
3.2.	El transporte nucleo-citosólico de los mRNAs del segmento 8 no debería estar alterado.....	147
3.3.	La traducción del mRNA del segmento 8 podría estar alterado.....	147
3.4.	El transporte de las RNPs virales es deficitario	148
4.	LA REGIÓN NO TRADUCIDA DEL SEGMENTO 7 DEL VIRUS DE LA GRIPE.....	149
	CONCLUSIONES.....	153
	BIBLIOGRAFÍA.....	147
	ANEXO.....	175

ABREVIATURAS

2'-5'OAS: 2'-5' oligoadenilato sintetasa

aa: aminoácido

ABTS: Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico

Ap: aptámero

ATCC: *American Type Culture Collection*

cap: caperuza

cat: cloranfenicol acetil transferasa

CC₅₀: concentración de citotoxicidad 50 %

cDNA: DNA complementario

Cels: células

Cys: cisteína

CMV: promotor de Citomegalovirus

cRNA: RNA viral de polaridad positiva

cRNP: RNP que encapsida una molécula de cRNA

C-terminal: extremo carboxilo terminal

CTD: dominio carboxilo terminal

CTI₅₀: concentración aptámero capaz de provocar una disminución del 50% de la síntesis de proteínas celulares

CPM: cuenta por millón

DEPC: dietil pirocarbonato

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetil sulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAsa: desoxirribonucleasa

DO: densidad óptica

DTT: DL-Ditiotreitol

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

ELONA: ensayo de oligonucleótido ligado a

enzimas

eIF: factor de iniciación de la traducción eucariota

Fig.: Figura

FMDV: virus de la fiebre aftosa

G A P D H: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GFP: proteína verde fluorescente

h: hora

HA: hemaglutinina

HCV: virus de la hepatitis C

His: histidinas

hPABP1: proteína humana de unión a colas de poli(A) 1

hpi: horas post-infección

HPRI: inhibidor de RNAsa de placenta humana

hpt: horas post-transfección

IC₅₀: concentración inhibitoria 50 %

IF: inmunofluorescencia

IFN: interferón

IPP: inmunoprecipitación

IPTG: Isopropil-β-D-tiogalacto-piranósido

IRES: sitios internos de entrada del ribosoma

IRF: factor de respuesta a interferón

IS: índice de selectividad

IT: índice terapéutico

KDa: kilodalton

KD: constante de disociación

LiPABP1: proteína de unión a colas de poli(A) 1 de *Leishmania infantum*

log: logaritmo en base 10

long: longitud

M: molar	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
M1: proteína de matriz 1	PKR: proteína quinasa R
M2: proteína de matriz 2	PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
MDI: multiplicidad de infección	PR8: cepa A/PR8/8/34 del virus de la gripe
Met: metionina	pre-mRNA: precursor de RNA mensajero
min: minuto	RRM: dominio de unión a RNA
mm: milímetro	RdRp: RNA polimerasa RNA dependiente
MOPS: ácido 3-(N-Morfolino) propanosulfónico	RNA: ácido ribonucleico
mRNA: RNA mensajero (<i>messenger RNA</i>)	RNAse: ribonucleasa
MTT: 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil) 2,5 difeniltetrazólico	RND40: librería de aptámeros original
MUT: mutante	RNP: ribonucleoproteína
NA: neuraminidasa	rRNA: RNA ribosomal
NEP: proteína de exportación nuclear	rpm: revoluciones por minuto
NES: señal de exportación nuclear	RT: retrotranscripción
NLS: señal de localización nuclear	RT-PCR: retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa
nm: nanómetro	SAB: suero albúmina bovina
nM: nanomolar	SDS: dodecilsulfato sódico
NP: nucleoproteína	SELEX: Enriquecimiento exponencial por sistemática evolución de ligandos
NS1: proteína no estructural del virus de la gripe	SFB: suero fetal bovino
nt: nucleótido	seg: segmento
N-terminal: extremo amino terminal	S.E.M: error estándar de la media
ORF: fase de lectura abierta	splicing: procesamiento de RNAs mensajeros
PA: proteína ácida del virus de la gripe	ssRNA: RNA de cadena sencilla
hPABP1: proteína humana de unión a colas de poli(A) ¹	TA: temperatura ambiente
pb: pares de bases	TBE: tampón tris borato EDTA
PB1: proteína básica 1 del virus de la gripe	TCA: ácido tricloroacético
PB2: proteína básica 2 del virus de la gripe	ts: termosensible
PBS: tampón fosfato salino	ufp: unidades formadoras de placa
PBSc: PBS completo	UTR: región no traducida
	VIC: cepa A/Victoria/3/75 del virus de la

gripe

vRNA: RNA viral genómico de polaridad negativa

vRNP: RNP que encapsida una molécula de vRNA

VTI₅₀: concentración de cada aptámero necesaria para disminuir un 50% la tasa de traducción de proteínas virales

WB: *Western blot*

WT: silvestre

μCi: microcurio

μg: microgramo

μl: microlitro

μM: micromolar

SUMMARY

The influenza A viruses (IAV) are members of the Orthomyxoviridae family & causes respiratory disease & continue to be one of the largest global threats to human health, causing 250.000-500.000 deaths per year & these numbers can be much larger in a pandemic. The virus possesses a negative-oriented segmented RNA genome that encodes for its own RNA-dependent RNA polymerase, which is error-prone. In addition, its segmented genome allows for exchange of RNA segments between genotypically different influenza viruses. These features confer a high genetic diversity & lead to generation of novel strains or/& subtypes & thus contribute to the permanent exposure of the human population to newly emerging & re-emerging influenza viruses. Although at present we have effective influenza antivirals that reduce virus dissemination, the appearance of resistant mutant viruses poses a serious limitation for their widespread use. Antiviral drugs that target cellular proteins may play major roles in combating virus resistance.

Influenza virus mRNAs are formally equivalent to the cellular mRNAs & a sophisticated strategy has been selected by the virus to enhance specifically the translation of viral mRNAs. In this context, previous work has demonstrated the role of NS1 & viral polymerase establishing productive interactions with eIF4G1 translation initiation factor & with the polyA binding protein 1 (hPABP1). Thus, the inhibition of viral proteins-translation factors interactions or their destabilization can be potentially used as an antiviral strategy. Recently, nucleic acid aptamers have been put forward for use as therapeutic agents against many human diseases due to their inhibitory ability & target specificity. In the present study, we have selected ssDNA aptamers specific to the human hPABP1, as possible inhibitors of IAV mRNA translation & as potential antivirals for influenza virus replication. Two aptamers (ApPABP7 & ApPABP11), which bind hPABP1 with high affinity have been characterized. Both aptamers inhibit influenza virus replication of H1N1 or H3N2 subtypes at high & low multiplicity of infection & the viral polymerase-eIF4G1 interaction. In addition, aptamer ApPABP11 inhibits the interactions between NS1 & eIF4G1 or hPABP1. These results provide support for a potential use of aptamers targeting viral-cellular interactions as novel antivirals against influenza virus replication.

In order to analyze the specific contribution of segment-specific sequences located adjacently to the promoter conserved nucleotides, we have generated a mutant library at the four adjacent nucleotides in the NS segment. The different mutants have been examined in a RNP reconstitution assay as well as in recombinant mutant viruses. A thorough analysis of these mutants shows that none of the mutations affect viral polymerase activity, while recombinant viruses that contain mutations in the first nucleotide adjacent to the viral promoter, produce a marked decreased accumulation of NS1. In addition, these mutants decrease viral proteins accumulation mainly at the early stages of the infection & nuclear retention of viral RNPS. Consequently these mutant viruses have a delayed production of infective particles with lower viral titres at one & multiple step curves.

INTRODUCCIÓN

EL VIRUS DE LA GRIPE

1. INTRODUCCIÓN Y GENERALIDADES

La gripe es una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa causada por virus de la familia *Orthomyxoviridae*. En su origen, estos virus son patógenos de aves silvestres, replicando eficazmente y sin causar enfermedad en muchas de las especies. Además, los cerdos pueden ser infectados por virus de origen aviar y humano, constituyendo un ambiente muy propicio para la recombinación de virus de diferente procedencia. Estos virus se transmiten a la población humana y, ocasionalmente, dan lugar a pandemias. Estas características, junto con su alta transmisibilidad y su amplio rango de hospedador, han hecho del virus de la gripe uno de los patógenos que más morbilidad y mortalidad ha causado en la historia.

Desde el punto de vista epidemiológico, el virus tipo A es el principal causante de las epidemias anuales en época de invierno. La gripe se transmite rápidamente durante las epidemias estacionales, afectando de un 10 a un 20% de la población general, causando una mortalidad que oscila entre el 0.1 y el

5% de las personas infectadas. Sin embargo, también es responsable de pandemias de gran impacto, generalmente asociadas a profundos cambios antigénicos contra los que los seres humanos presentan una débil inmunidad. A lo largo del siglo XX, se han producido tres grandes pandemias que se corresponden con la aparición de los subtipos H1N1 (1918-19, gripe española), H2N2 (1957-58, gripe asiática) y H3N2 (1968-69, gripe de Hong Kong). En Diciembre de 1997, apareció un nuevo subtipo aviar H5N1, proveniente de aves importadas desde China, susceptible de generar una nueva pandemia (Hatta, Gao et al. 2001). Sin embargo, a pesar de su elevada mortalidad, este virus no adquirió la capacidad de transmitirse entre humanos. Más recientemente, un nuevo subtipo de origen porcino, el pH1N1, se extendió desde Méjico en junio de 2009 (Neumann, Noda et al. 2009). A diferencia del virus aviar H5N1, este subtipo se caracterizó por una alta transmisibilidad entre la población humana aunque con una mortalidad convencional (Itoh, Shinya et al. 2009). Estas características, junto con la globalización del

mundo actual, han propiciado la expansión del virus pH1N1 en un tiempo récord, permitiendo la cohabitación intermitente con el subtipo H3N2 en las epidemias anuales.

Los virus clínicamente relevantes en humanos son los tipos A y B, pero únicamente los primeros han producido pandemias desde el siglo XX. De este modo, a lo largo de esta Memoria se va a hacer referencia únicamente al género *Influenzavirus A*, ya que es el que afecta de forma más importante a humanos y por ello, constituye el principal modelo de estudio del laboratorio.

2. LA PARTÍCULA VIRAL

Las partículas virales son pleiomórficas y heterogéneas (Horne, Waterson et al. 1960, Hoyle, Horne et al. 1961). Se caracterizan por poseer una envuelta lipídica, derivada de la membrana plasmática de las células que infectan (Compans & Choppin 1975), sobre la que se anclan las glicoproteínas de membrana HA (Hemaglutinina) y NA (Neuraminidasa), formando espículas radiales de 10-14 nm y constituyendo los principales determinantes antigénicos (**Fig. I1**).

2.1. Proteínas virales

La glicoproteína **HA** forma un homotrímero de estructura globular. Sus funciones más importantes son el reconocimiento del receptor celular (ácido siálico) y la fusión de la membrana viral con la celular para permitir la entrada del virus (Weis, Brown et al. 1988). La glicoproteína **NA** se organiza en un homotetrámero con forma de bastón (Colman, Varghese et al. 1983). Está implicada en el procesamiento de los residuos de ácido siálico presentes tanto en los viriones progenie, evitando su agregación, como en la membrana celular, favoreciendo la salida del virus de la célula infectada (Palese & Schulman 1974, Palese & Compans 1976). En la envuelta del virión también se ancla la proteína **M2** (Zebedee & Lamb 1988), formando tetrámeros que constituyen un canal iónico transmembrana (Sansom, Kerr et al. 1997), esencial para la liberación de las ribonucleoproteínas (RNPs) al citoplasma durante la entrada del virus a la célula (Takeda, Pekosz et al. 2002). También está implicada en la determinación de la morfología (Roberts, Lamb et al. 1998), así como en el ensamblaje

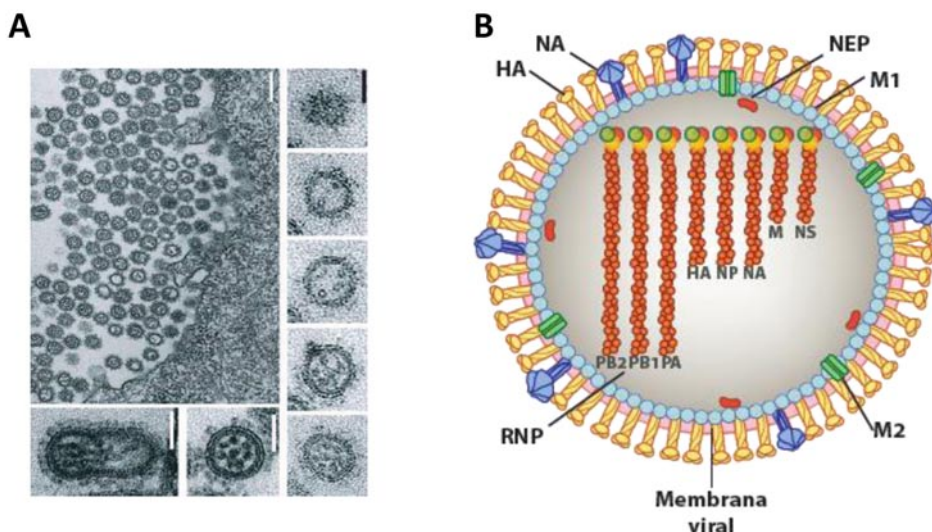


Figura 11. El virus de la gripe. A) Estructura del virión. La micrografía electrónica de mayor tamaño corresponde a viriones saliendo de células MDCK a 10 hpi. Los puntos electrodensos en el interior del virión corresponden a las RNPs. Las micrografías electrónicas pequeñas corresponden a secciones seriadas de un virión donde se observan 7 RNPs alineadas en forma de anillo con una octava RNP central. Adaptado de (Noda et al 2006). **B)** Representación gráfica de una partícula viral en la que se muestran las glicoproteínas de membrana, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), el canal iónico M2, la proteína matriz M1, la proteína NEP, las ocho RNPs y la membrana del virus derivada de la membrana celular (Adaptado de Jorba 2009).

y liberación de viriones (Hughey, Roberts et al. 1995, Schroeder, Heider et al. 2005). Bajo la envuelta lipídica, formando una malla estructural, se encuentra la matriz proteica del virión compuesta por la proteína **M1**. Es la proteína más abundante del virus e interacciona tanto con los tallos citoplasmáticos de las proteínas de la envuelta, como con las RNPs del interior del virion (Ye, Pal et al. 1987, Enami & Enami 1996). La proteína **NEP** es la proteína estructural menos abundante (Richardson & Akkina 1991) y se la ha relacionado con la salida de las RNPs progenie al citoplasma (O'Neill, Talon et al. 1998, Neumann, Hughes

et al. 2000), así como con la regulación de los procesos de transcripción y replicación del RNA viral (Robb, Smith et al. 2009).

En el interior de la partícula viral se encuentra el genoma segmentado del virus, organizado en ocho RNPs. Cada una de ellas está compuesta por un segmento de RNA genómico superenrollado (Hsu, Parvin et al. 1987) cuyos extremos presentan complementariedad parcial e invertida, de modo que al interaccionar entre sí constituyen el promotor viral, al que se ancla la polimerasa del virus, un heterotrímero formado por las subunidades **PB1**, **PB2** y **PA**. El resto del

segmento de RNA se encuentra tapizado en toda su longitud por la proteína **NP** (Klump, Ruigrok et al. 1997). Estas RNPs constituyen las unidades funcionales básicas que llevan a cabo los procesos de transcripción y replicación en el núcleo de la célula infectada.

La proteína **NS1** se expresa a partir del transcrito primario del segmento 8 y se produce desde etapas tempranas de la infección, localizándose principalmente en el núcleo de la célula infectada (Briedis, Conti et al. 1981), aunque a tiempos tardíos también se puede encontrar en el citoplasma asociada a polisomas (de la Luna, Fortes et al. 1995, Falcon, Fortes et al. 1999). Se le atribuyen un gran número de funciones en las distintas etapas del ciclo de infección y resulta fundamental para la inhibición de la respuesta mediada por interferón que se desencadena en la célula huésped, así como para la regulación de multitud de procesos claves para el éxito de la infección.

Además de las diez proteínas estructurales descritas, las proteínas PB1-F2, N40, PA-X, PA-155, PA-182 y PB2-S1 también se expresan durante la infección,

pero no han sido descritas en el virión.

Las proteínas **PB1-F2** y **N40** son sintetizadas a partir de una fase de lectura y un codón de iniciación alternativos del mRNA del segmento PB1, respectivamente (Chen, Calvo et al. 2001, Wise, Foeglein et al. 2009). PB1-F2 se localiza en la membrana mitocondrial y se relaciona con procesos apoptóticos (Gibbs, Malide et al. 2003), así como con la regulación de la actividad de la polimerasa viral mediante su interacción con la subunidad PB1 (Mazur, Anhlán et al. 2008). La proteína N40 es una versión truncada de PB1 que, a diferencia de ésta, carece de actividad transcriptasa y aunque no es esencial para la viabilidad del virus, su eliminación provoca una disminución en la actividad replicativa en ciertos fondos genéticos (Wise, Foeglein et al. 2009).

Las proteínas **PA-X**, **PA-155** y **PA-182** se derivan del segmento 3. Aunque por el momento se desconocen muchos detalles de estas proteínas, se sabe que PA-X modula la respuesta de la célula hospedadora frente a la infección (Jagger, Wise et al. 2012) y virus que carecen de las proteínas PA-155 y PA-182 disminuye significativamente su replicación y

patogenicidad (Muramoto, Noda et al. 2013).

Recientemente se ha identificado una nueva proteína que es el resultado de la traducción de un transcrito alternativo del segmento 1. Se le ha denominado **PB2-S1** y se localiza en las mitocondrias de las células infectadas. Inhibe la respuesta a interferón mediada por RIG-I e interfiere con la actividad de la polimerasa viral a través de su unión a la subunidad PB1 (Yamayoshi, Watanabe et al. 2015).

2.2. Organización genómica y RNAs virales sintetizados en la célula infectada

El genoma del virus de la gripe está formado por 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa (Inglis, Carroll et al. 1976) (**Fig. I2**). En la célula infectada los segmentos 4, 5 y 6 codifican una única proteína, mientras que los segmentos 1, 2, 3, 7 y 8 codifican varias, expresándose un total de 16 proteínas virales (Lamb & Choppin 1979, Lamb, Choppin et al. 1980, Lamb, Lai et al. 1981, Chen, Calvo et al. 2001, Yamayoshi, Watanabe et al. 2015).

Durante la infección por el virus de la gripe, y fruto de la actividad de la polimerasa viral, se pueden encontrar en el núcleo de la célula infectada tres tipos de RNAs virales (**Fig. I3**):

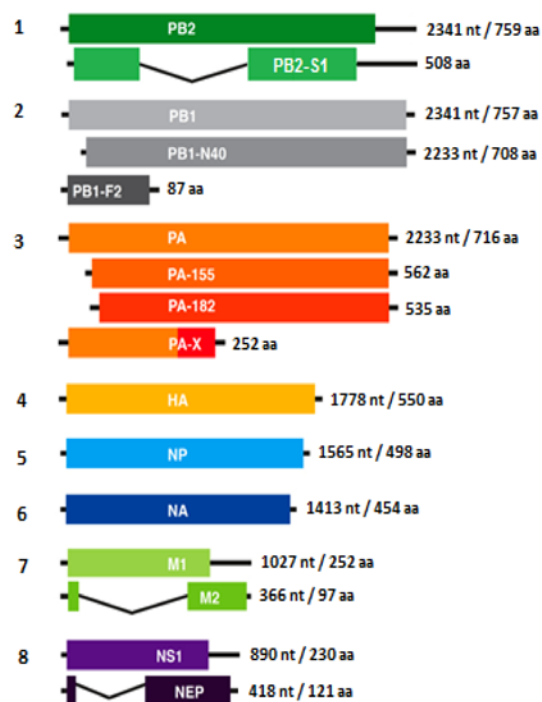


Figura I2. Estructura del genoma del virus de la gripe. Se representan cada uno de los segmentos de gripe. El número del segmento se muestra a la izquierda y la longitud tanto del segmento (en nucleótidos) como de la proteína que codifican (en aminoácidos), a la derecha. Las regiones codificantes se representan como cajas coloreadas, los extremos no codificantes como líneas negras y los intrones como líneas en forma de V (Adaptado de Jorba 2009).

2.2.1. vRNAs o RNAs genómicos

Son los RNAs presentes en las RNPs paternas y los que se ensamblan para dar lugar a las RNPs progenie, por lo que constituyen la forma de RNA presente en los viriones. Se caracterizan por ser RNAs de cadena sencilla y polaridad negativa, así como por poseer extremos 5'trifosfato y 3'-OH (Young & Content 1971). Próximo al extremo 5' contienen una zona rica en uridinas, que se utiliza como molde para la poliadenilación de los mRNAs

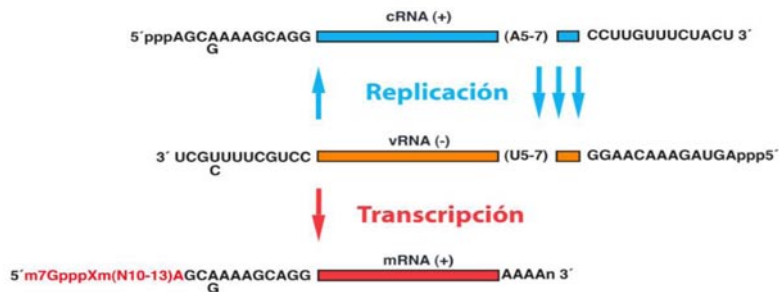


Figura 13. Síntesis de los distintos tipos de RNAs virales. Se representa en naranja el vRNA de polaridad negativa, que constituye la forma genómica a partir de la cual se generan el cRNA (color azul) y el mRNA (color rojo), ambos de polaridad positiva.

virales (Robertson 1979, Luo, Luytjes et al. 1991). El resto del RNA se encuentra recubierto por monómeros de NP (Klump, Ruigrok et al. 1997) formando las RNPs virales o vRNPs (Tiley, Hagen et al. 1994, Martin-Benito, Area et al. 2001, Coloma, Valpuesta et al. 2009, Arranz, Coloma et al. 2012).

2.2.2. cRNAs o RNAs complementarios

Constituyen intermediarios de la replicación viral, ya que se utilizan como molde para generar las nuevas copias de vRNA que serán incorporadas en la progenie viral. Son una copia completa y de polaridad positiva del vRNA. Poseen extremos 5'trifosfato y 3'-OH y, al igual que el vRNA, el cRNA se encuentra en todo momento formando cRNPs, pero éstas nunca salen del núcleo de la célula infectada (Krug, St Angelo et al. 1987) y no se encapsidan en los nuevos viriones.

2.2.3. mRNAs o RNAs mensajeros

Son el producto de la transcripción del

vRNA llevada a cabo por la polimerasa viral, por lo que poseen polaridad positiva. Se trata de copias incompletas del vRNA, que carecen de la zona complementaria al extremo 5' de éste. En su lugar, poseen una cola de poli-adeninas de longitud variable, generada a través de la copia reiterada, mediada por la polimerasa viral, del tramo de uridinas cercano al extremo 5' del vRNA. En su extremo 5' presentan un oligonucleótido heterogéneo de entre 10 y 13 nucleótidos de longitud, que presenta estructura *cap* tipo I (m7GpppN) procedente de pre-mRNAs celulares transcritos por la RNA polimerasa II celular (RNAP II) (Krug, Broni et al. 1979). Estos oligonucleótidos con estructura *cap*, los “roba” la polimerasa viral gracias a su actividad endonucleolítica (Plotch, Bouloy et al. 1981, Doan, Handa et al. 1999) para utilizarlos como cebadores en la transcripción viral.

Ambas modificaciones post-

transcripcionales dan lugar a mRNAs virales estructuralmente indistinguibles de los celulares, a pesar de estar generados por mecanismos totalmente diferentes.

2.3. La RNP viral

Los segmentos de RNA viral no existen como RNAs desnudos sino que se asocian a la RNA polimerasa viral y a moléculas de nucleoproteína (NP) para dar lugar a complejos de RNPs (Portela, Zurcher et al. 1999). La proteína mayoritaria de las RNPs es la NP, que recubre todo el genoma excepto los nucleótidos terminales parcialmente complementarios, que permanecen unidos a la polimerasa viral (Klump, Ruigrok et al. 1997).

2.3.1. La polimerasa viral

La enzima responsable de la síntesis de RNA viral en el núcleo de la célula infectada, tanto a través de la transcripción como de la replicación, es el complejo de la polimerasa viral. Se trata de una RNA polimerasa dependiente de RNA y está compuesta por las subunidades PB1, PB2 y PA formando un heterotrímero (Detjen, St Angelo et al. 1987, Digard, Blok et al. 1989) con una relación estequiométrica 1:1:1 (Kato, Mizumoto et al. 1985, Honda,

Mukaigawa et al. 1990). Experimentos de reconstitución de vRNPs y cRNPs activas *in vivo*, indican que las tres subunidades son necesarias para llevar a cabo los procesos de transcripción y replicación viral en el núcleo de las células infectadas (Perales & Ortin 1997).

a) La subunidad PB1

Es la subunidad más conservada evolutivamente y realiza la función de polimerización, catalizando la adición secuencial de nuevos nucleótidos a la cadena de RNA naciente (Ulmanen, Broni et al. 1981, Braam, Ulmanen et al. 1983). Además, PB1 actúa como núcleo del complejo, interaccionando de manera independiente con PB2 y PA (Digard, Blok et al. 1989, Biswas & Nayak 1996) y uniendo también NP (Biswas, Boutz et al. 1998, Medcalf, Poole et al. 1999). Se ha descrito que PB1 presenta homología de secuencia con otras DNA y RNA polimerasas y contiene cinco motivos proteicos conservados en las RNA polimerasas dependientes de RNA (Kobayashi, Toyoda et al. 1996), esenciales para la actividad transcripcional de la polimerasa (Mahy 1983, Biswas & Nayak 1996).

b) La subunidad PB2

Tiene un papel fundamental en la iniciación de la transcripción, ya que es la responsable del reconocimiento de estructuras *cap* en los mRNAs celulares que se usan como cebadores de la síntesis de los mRNAs virales (Plotch, Bouloy et al. 1981, Blaas, Patzelt et al. 1982). Es reclutada al complejo de la polimerasa por interacciones proteína-proteína con la subunidad PB1 (Digard, Blok et al. 1989, Poole, Elton et al. 2004) y también interacciona directamente tanto con NP (Biswas, Boutz et al. 1998, Medcalf, Poole et al. 1999, Poole, Elton et al. 2004) como con PA (Hemerka, Wang et al. 2009). También se ha descrito su participación en la replicación viral, dado que mutantes puntuales en PB2 tienen alterada la replicación pero no la transcripción viral (Gastaminza, Perales et al. 2003).

c) La subunidad PA

Es una fosfoproteína necesaria para la formación de una polimerasa activa (de la Luna, Martin et al. 1993, Sanz-Ezquerro, Fernandez Santaren et al. 1998). Posee actividad endonucleasa que, junto con su similitud estructural con las nucleasas de restricción

de tipo II y el fenotipo de mutantes puntuales (Fodor, Crow et al. 2002), indica un papel fundamental en el corte endonucleotídico de los pre-mRNAs celulares para generar los oligonucleótidos utilizados como cebadores en la transcripción viral (Dias, Bouvier et al. 2009, Yuan, Bartlam et al. 2009). Atendiendo al fenotipo de mutantes termosensibles, se le ha asignado a la subunidad PA un papel importante en el proceso de replicación (Mahy 1983). Además, PA tiene actividad proteolítica (Sanz-Ezquerro, de la Luna et al. 1995, Sanz-Ezquerro, Zurcher et al. 1996, Hara, Shiota et al. 2001) y se ha relacionado esta capacidad con la degradación de la RNA polimerasa II celular (RNAP II) durante la infección (Rodriguez, Perez-Gonzalez et al. 2007, Rodriguez, Perez-Gonzalez et al. 2009), así como con la patogenicidad (Llompарт, Nieto et al. 2014).

2.3.2. La nucleoproteína o NP

Es el componente mayoritario de las RNPs y encapsida el genoma viral, por lo que desempeña un papel fundamental en la organización estructural de las mismas. Es una proteína básica que oligomeriza e interacciona con el RNA de manera

cooperativa e independiente de secuencia (Yamanaka, Ishihama et al. 1990, Baudin, Bach et al. 1994). La estequiometría de la interacción de NP con el RNA es de una molécula de NP cada 24 nucleótidos (Shaw, Lamon et al. 1982, Ortega, Martin-Benito et al. 2000). Además, la NP es necesaria para los procesos de transcripción y replicación del genoma viral (Honda, Ueda et al. 1988).

3. EL CICLO DE INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA GRIPE

El ciclo viral se desarrolla en células epiteliales del tracto respiratorio superior e inferior de vertebrados. Presenta una duración de ocho horas, y está muy bien regulado tanto temporal, como espacialmente. Se pueden distinguir varias etapas que se describen a continuación:

3.1. Adsorción y entrada de las partículas virales

La infección comienza con la interacción entre el virus y la célula diana. La glicoproteína HA de la superficie del virus se une al receptor celular por medio del ácido siálico, presente en glicoproteínas y glicolípidos (Weis, Brown

et al. 1988) (**Fig. I4-1**). Tras la adsorción, la entrada del virus se produce por endocitosis mediada por receptor (Matlin, Reggio et al. 1981, Matlin, Reggio et al. 1982, Sieczkarski & Whittaker 2002) y, una vez formada la vesícula, ésta se fusiona con lisosomas dando lugar a endolisosomas con un interior ácido. La acidez de estas vesículas favorece la entrada de protones al interior del virión a través del canal iónico M2 (Helenius 1992, Pinto, Holsinger et al. 1992), desestabilizando la interacción entre las RNPs y M1. Además, el pH ácido provoca un cambio conformacional de la proteína HA que induce la fusión de las membranas del virus y de la vesícula endocítica, produciéndose la liberación de las RNPs al citoplasma (Stegmann, Booy et al. 1987, Stegmann, Morselt et al. 1987, Skehel, Bizebard et al. 1995) (**Fig. I4-2**). Una vez en el citoplasma, las RNPs son transportadas al núcleo (O'Neill, Jaskunas et al. 1995, Cros, Garcia-Sastre et al. 2005) (**Fig. I4-3**) donde tendrán lugar los procesos de transcripción y replicación.

3.2. Transcripción, replicación y expresión génica

Cuando las RNPs entran en el núcleo

de la célula infectada llevan a cabo una primera ronda de transcripción (transcripción primaria) (**Fig. 14-4**). Los mRNAs generados son transportados al citoplasma y traducidos por la maquinaria celular (**Fig. 14-5**). Las proteínas virales sintetizadas son transportadas al núcleo y provocan el cambio de la síntesis transcripcional a la síntesis replicativa generándose las cRNPs (**Fig. 14-6**) que son intermediarios de la replicación y sirven de molde para dar lugar a las vRNPs (**Fig. 14-7**). A su vez, durante la

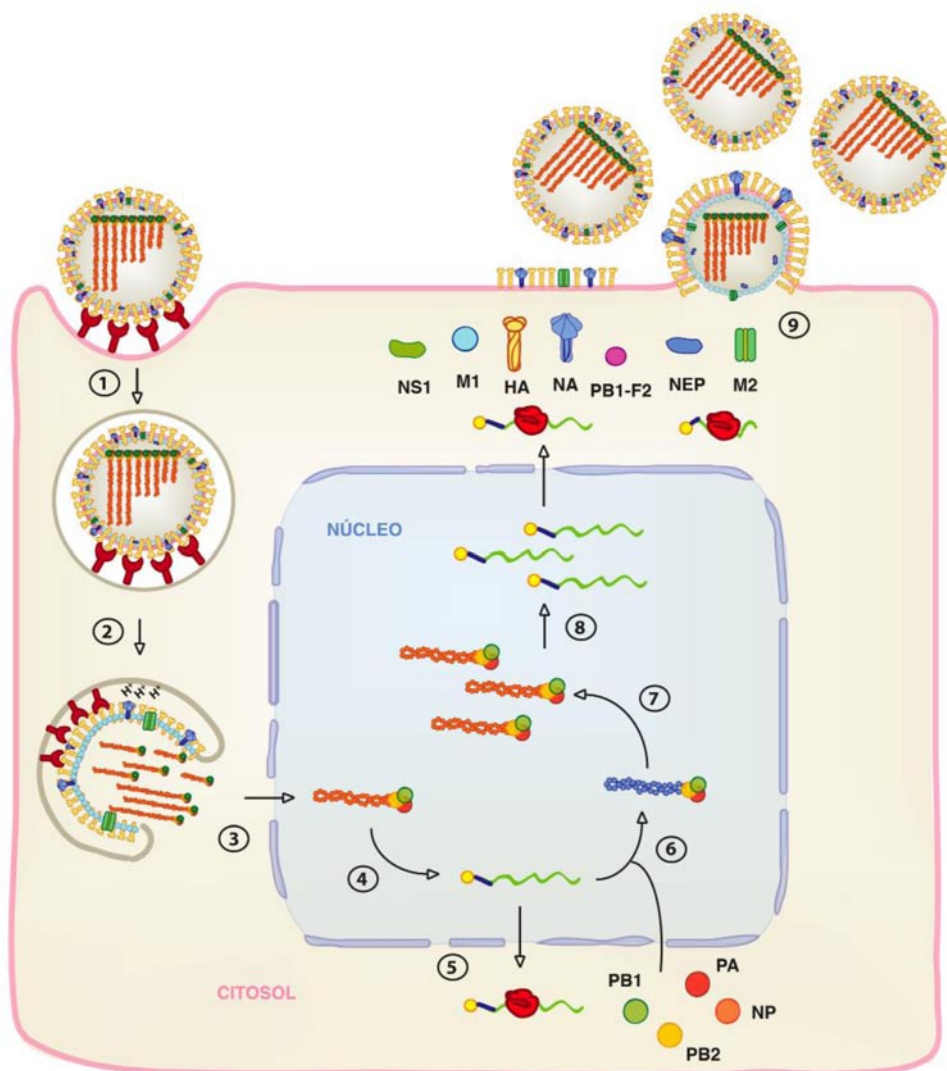


Figura 14. Ciclo de infección viral. Esquema de las etapas de la infección del virus de la gripe. Se representan mRNAs virales (en verde), la maquinaria de traducción celular (en rojo), las cRNPs (en azul) y las vRNPs (en naranja). Los números muestran las fases del ciclo de infección que se indican a continuación: **(1)** adsorción y entrada del virus, **(2)** liberación de las RNPs al citoplasma, **(3)** entrada de las RNPs al núcleo, **(4)** transcripción primaria, **(5)** traducción de proteínas virales, **(6)** transporte de las proteínas virales al núcleo y formación de cRNPs durante la replicación viral, **(7)** formación de vRNPs, **(8)** transcripción secundaria y **(9)** ensamblaje y liberación de viriones (Adaptado de Jorba, 2009).

transcripción secundaria, las vRNPs sirven de molde para dar lugar a los mRNAs virales (**Fig. 14-8**). Este proceso es indistinguible de la transcripción primaria, pero el nivel de síntesis es superior ya que la concentración de vRNPs es muy elevada tras los procesos de replicación. En este momento, los procesos de replicación y transcripción secundaria están fuertemente acoplados, mientras que más tarde en la infección se desacoplan y las vRNPs presentes en el núcleo se destinarán a la formación de nuevos viriones.

3.2.1. La transcripción viral

En el proceso de transcripción, la subunidad PB2 de la polimerasa viral reconoce la estructura *cap* de los pre-mRNAs celulares, y los RNAs no codificantes de pequeño tamaño (Gu, Gallagher et al. 2015). Mediante un proceso denominado *cap snatching* (Bouloy, Plotch et al. 1978, Krug, Broni et al. 1979), la subunidad PA media el corte endonucleolítico de estos RNAs celulares, generando fragmentos de 9 a 15 nucleótidos de longitud, con una estructura 5' *cap* y un extremo 3'OH (Plotch, Bouloy et al. 1981) que serán utilizados como cebadores para el inicio de la

transcripción. A continuación, la polimerasa viral, mediante la actividad RNA polimerasa RNA dependiente residente en PB1 (Klump, Ford et al. 1998), lleva a cabo la elongación del cebador por adición de los ribonucleótidos complementarios al molde hasta alcanzar la señal de poliadenilación presente en el vRNA. Se ha propuesto que el extremo 5' del vRNA permanece unido a la polimerasa en todo el proceso de transcripción (Pritlove, Poon et al. 1998). De este modo, el impedimento estérico generado por la polimerasa al llegar al extremo 5' provocaría la copia reiterada del tramo de uridinas. De acuerdo con esta propuesta, mutaciones en el extremo 5' del vRNA dan lugar a una iniciación de la transcripción eficiente pero los transcritos no son poliadenilados (Poon, Pritlove et al. 1999).

Como resultado de la transcripción, se generan mRNAs virales indistinguibles de los mRNAs celulares, si bien resultan de procesos de *capping* y poliadenilación completamente distintos. Estudios de trans-complementación genética, en los que se ha rescatado el fenotipo de vRNPs generadas con un mutante de PB2 defectivo en transcripción, han permitido

determinar que la síntesis de mRNA viral se realiza en *cis* por la polimerasa residente en la vRNP (Jorba, Coloma et al. 2009).

3.2.2. La replicación viral

La replicación tiene lugar en dos pasos: primero, a partir de las vRNPs paternas (procedentes del virión infectante) se generan las cRNPs que son intermediarios replicativos, y a partir de las cRNPs se generan vRNPs progenie que serán encapsidadas en los nuevos viriones. Junto con la síntesis de polimerasa viral, la replicación requiere la síntesis de NP que, además de encapsidar el RNA recién sintetizado (Beaton & Krug 1984), aumenta la procesividad de la polimerasa durante la replicación (Honda, Ueda et al. 1988) y resulta imprescindible para superar la señal de poliadenilación (Beaton & Krug 1986). Al contrario de lo que se ha observado para la transcripción viral, estudios de transcomplementación genética han permitido determinar que la replicación viral se realiza en *trans* por acción de una polimerasa soluble diferente a la residente en la RNP (Jorba, Coloma et al. 2009). Además, la iniciación de la replicación tiene

lugar en ausencia de cebador y el extremo 5' resultante tiene un trifosfato. Por otro lado, la elongación del RNA no se detiene en la señal de poliadenilación sino que continúa hasta el final del molde en un evento denominado anti-terminación (Hay, Skehel et al. 1982).

3.2.3. Procesamiento de los mRNAs y traducción de proteínas virales

La eliminación de los intrones de los transcritos virales es llevada a cabo por la maquinaria celular (Lamb & Lai 1982, Lamb & Lai 1984), aunque se sabe que también participa la polimerasa viral (Shih, Nemeroff et al. 1995), así como la proteína NS1 (Fortes, Beloso et al. 1994, Fortes, Lamond et al. 1995, Qiu, Nemeroff et al. 1995, Garaigorta & Ortin 2007). Los mRNAs virales transcritos y procesados, son transportados al citosol de la célula infectada de manera muy rápida y eficaz a través de la membrana nuclear (Shapiro, Gurney et al. 1987). En este momento de la infección el virus toma el control de la célula, ya que una vez en el citoplasma, los mRNAs virales se traducen más eficazmente que los mRNAs celulares y además, el virus ejerce una regulación negativa sobre estos

últimos, reduciendo drásticamente su traducibilidad (Katze, Lara et al. 1989, Katze & Krug 1990, Garfinkel & Katze 1992, Yanguéz & Nieto 2011). Esta regulación negativa en el citoplasma, junto con otros procesos principalmente nucleares, contribuye a un efecto global de inhibición de síntesis de las proteínas de la célula infectada, un proceso conocido como *shut-off* de proteínas celulares. La traducción selectiva de mRNAs virales se describirá en detalle en esta Memoria.

3.3. Ensamblaje y liberación de los viriones

En la fase tardía del ciclo de infección, entre 5 y 6 hpi comienza la formación de nuevas partículas virales. Las vRNPs que van a formar parte de la progenie viral son transportadas al citosol a través del poro nuclear mediante un transporte activo en el que intervienen las proteínas M1 (Martin & Helenius 1991), NEP y NP (O'Neill, Talon et al. 1998, Elton, Simpson-Holley et al. 2001). Una vez en el citoplasma, las vRNPs son transportadas por microfilamentos de actina hasta regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol denominadas *lipid rafts* (Avalos, Yu et al. 1997, Ali, Avalos et al. 2000), a las que previamente

se han anclado las proteínas HA, NA y M2 (Scheiffele, Rietveld et al. 1999, Simpson-Holley, Ellis et al. 2002, Nayak, Hui et al. 2004). El empaquetamiento del genoma viral requiere de la incorporación de las 8 vRNPs para generar viriones infectivos. Existen numerosas evidencias que apoyan un modelo de empaquetamiento dirigido de las 8 vRNPs, que se seleccionan y organizan siguiendo una distribución constante de 7 vRNPs en forma de anillo alrededor de una RNP central en el interior de la partícula (Noda, Sagara et al. 2006, Nayak, Balogun et al. 2009). Esta selección podría estar dirigida por secuencias en *cis* presentes en los extremos 5' y 3' de los segmentos genómicos (Fujii, Goto et al. 2003, Watanabe, Watanabe et al. 2003, Fujii, Fujii et al. 2005, Liang, Hong et al. 2005, Muramoto, Noda et al. 2006, Muramoto, Takada et al. 2006, Noton, Medcalf et al. 2007, Liang, Huang et al. 2008, Ozawa, Maeda et al. 2009).

La liberación de las partículas se produce mediante un fenómeno de gemación o *budding*, mecanismo mediante el cual el virus adquiere su envuelta lipídica (**Fig. 14-9**). Se ha propuesto que la proteína M1 es el principal

organizador del ensamblaje de los nuevos viriones (Gomez-Puertas, Mena et al. 1999, Gomez-Puertas, Albo et al. 2000), aunque también se ha implicado a M2 en este proceso (Iwatsuki-Horimoto, Horimoto et al. 2006, McCown & Pekosz 2006). Finalmente, gracias a la acción catalítica de NA se liberan los nuevos viriones al espacio extracelular (Schulman & Palese 1977, Liu, Eichelberger et al. 1995).

LAS REGIONES NO TRADUCIDAS DEL GENOMA VIRAL

El genoma segmentado de los virus de la familia *Orthomyxoviridae* posee una organización similar en cada segmento. Todos comparten una región central codificante, con uno o más marcos abiertos de lectura (ORFs), flanqueados por secuencias no traducidas de menor longitud (UTRs o regiones no codificantes) (Lamb & Horvath 1991).

Estas secuencias no codificantes están implicadas en procesos esenciales para el ciclo viral tales como la replicación, transcripción y traducción de los RNAs virales (Park & Katze 1995, Bergmann & Muster 1996, Zheng, Palese et al. 1996, Crescenzo-Chaigne, Barbezange et al. 2008), el *splicing* (Zheng, Wang et al. 2015), la poliadenilación (Poon, Pritlove et al. 1998) y el empaquetamiento (Fujii, Goto et al. 2003, Watanabe, Watanabe et al. 2003, Fujii, Fujii et al. 2005, Liang, Hong et al. 2005, Muramoto, Noda et al. 2006, Muramoto, Takada et al. 2006, Noton, Medcalf et al. 2007, Liang, Huang et al. 2008, Ozawa, Maeda et al. 2009) de los vRNAs en los viriones.

Comúnmente han sido divididas en

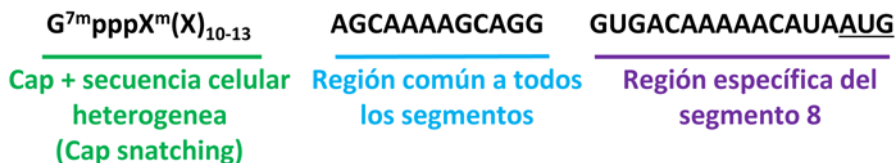


Figura I5. Organización de los extremo no traducidos de los segmentos virales. Se presenta la secuencia del mRNA del segmento 8. Los mRNAs virales tienen una estructura cap en el extremo 5' derivada de los pre-mRNAs celulares que son utilizados por la polimerasa del virus como iniciadores en la transcripción viral. A continuación, se encuentra una secuencia común a los mRNAs de todos los segmentos, complementaria a la región promotora del extremo 3' del vRNA. Adyacentemente, se encuentra una secuencia de longitud variable, específica da cada segmento.

dos partes claramente diferenciables es que poseen complementariedad parcial e atendiendo a su grado de conservación: por invertida, permitiendo el apareamiento entre un lado hay una región distal, de secuencia ellos y constituyendo así el sitio de anclaje común a todos los segmentos y altamente de la polimerasa viral (Hagen, Chung et al. conservada; y adyacente a ésta, hay una 1994). De este modo, conforman el promotor región específica de segmento, cuyo grado viral, responsable de la transcripción y de conservación ha sido considerado algo replicación viral (Fodor, Pritlove et al. 1994). menor (Bergmann & Muster 1996) (**Fig. I5**).

1.1. Estructura de la región promotora del vRNA

1. LA REGIÓN COMÚN A TODOS LOS SEGMENTOS: EL PROMOTOR VIRAL

Estudios centrados en el análisis de la secuencia de las UTRs de los vRNAs virales han revelado que todos los segmentos virales presentan 12 y 13 nucleótidos en los extremos 3'UTR y 5'UTR, respectivamente, altamente conservados entre diferentes cepas (Skehel & Hay 1978, Robertson 1979, Desselberger, Racaniello et al. 1980). Una característica fundamental de estos nucleótidos terminales,

En cuanto a la estructura del promotor viral de los RNAs genómicos, se han descrito cuatro modelos principales basados en experimentos *in vitro* e *in vivo* (**Fig. I6**):

a) Disposición en forma de mango de sartén o **panhandle**: ensayos de *cross-linking* y ensayos estructurales apoyan el apareamiento de los nucleótidos terminales del promotor (Robertson 1979, Desselberger, Racaniello et al. 1980, Hsu, Parvin et al. 1987, Baudin, Bach et al. 1994, Bae,

Cheong et al. 2001, Lee, Bae et al. 2003).

b) Disposición en forma de tenedor o *RNA-fork*: respaldada por ensayos de mutagénesis, es una estructura híbrida entre RNA de doble cadena y RNA de cadena sencilla. Se sugiere que la zona de doble cadena es estabilizada por uniones RNA-proteína y proteína-proteína mediadas por la polimerasa viral (Fodor, Pritlove et al. 1995, Kim, Fodor et al. 1997).

c) Disposición en forma de sacacorchos o *corkscrew*: esta estructura está basada en la de RNA-fork, sin embargo propone que los extremos 5' y 3', que no se aparean entre ellos, forman un dúplex consigo mismos. Cada uno de los extremos del RNA forma una estructura de *hairpin loop* (Flick, Neumann et al. 1996, Flick & Hobom 1999, Tomescu, Robb et al. 2014). Se ha demostrado que la presencia de estas estructuras *stem-loop* en los extremos del RNA son críticas para la interacción del promotor con la polimerasa viral (Brownlee & Sharps 2002), así como para la activación de la actividad endonucleasa de la polimerasa y el proceso de poliadenilación (Pritlove, Poon et al. 1999, Leahy, Pritlove et al. 2001).

d) Disposición en forma híbrida de

corkscrew-fork: publicaciones recientes en las que se presentan la estructura cristalina de la polimerasa del virus de la *Influenza A* de murciélago, unida al promotor del vRNA, han confirmado la estructura del loop del extremo 5', pero no han hallado ningún *loop* en la región 3'. De este modo, se propone que la unión de la polimerasa induce un cambio conformacional de estos nucleótidos, adoptando una estructura híbrida (Pritlove,

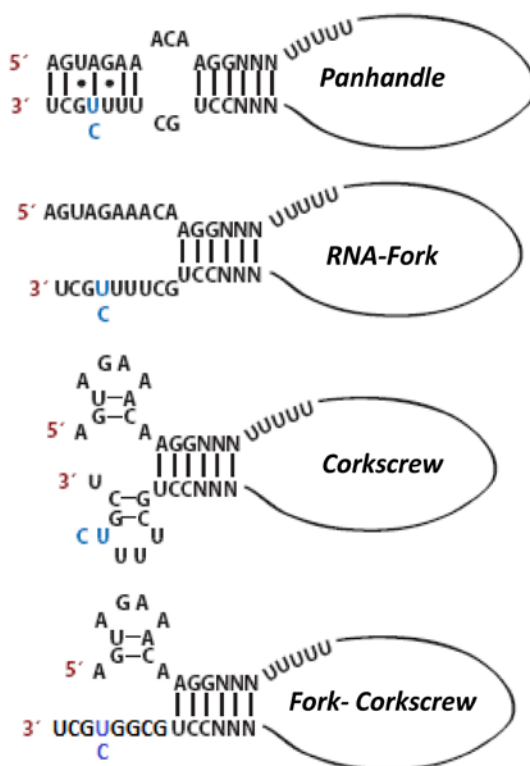


Figura I6. Modelos de la estructura secundaria propuestas para el promotor viral. Se muestran los nucleótidos conservados de los extremos 5' y 3' del RNA genómico del virus, así como un segmento específico de nucleótidos (NNN). La señal de poliadenilación en el extremo 5' se muestra como una poli(U) expandida. También se indican los pares de bases Watson-Crick (Adaptado de Palese & Shaw 2007, Pflug et al. 2014).

Poon et al. 1999, Pflug, Guilligay et al. 2014, Reich, Guilligay et al. 2014), que es la que exhibe la actividad promotora.

Además, se ha descrito que existen diferencias entre las estructuras de los promotores de las vRNPs y las cRNPs que implican estrategias de iniciación de la síntesis replicativa distintas (Deng, Vreede et al. 2006) e interacciones con diferentes proteínas en cada caso (Nagata, Kawaguchi et al. 2008). De este modo, podría haber varios mecanismos de control de la síntesis de RNA viral.

1.2. Función de los nucleótidos de la región promotora del vRNA

Se ha descrito que, tanto los primeros 10 nucleótidos (del 1 al 10) del extremo 5', como los 9 primeros nucleótidos (del 1 al 9) del extremo 3', son necesarios para los procesos de síntesis del mRNA viral poliadenilado (Pritlove, Poon et al. 1999) y para la actividad endonucleasa (Leahy, Dobbyn et al. 2001), respectivamente. De igual modo, los nucleótidos localizados en las posiciones 11 a 13 en la región 5'UTR y en las posiciones 10 a 12 en la región 3'UTR (5'AGG3' y 5'UCC3', respectivamente) son totalmente necesarios para la utilización de

las estructuras *cap* como cebadores (Hagen, Chung et al. 1994), el inicio y terminación de la transcripción (Fodor, Pritlove et al. 1994), la poliadenilación (Poon, Pritlove et al. 1998) y el empaquetamiento (Hsu, Parvin et al. 1987).

Por otro lado, cabe destacar que el nucleótido 4 del extremo 3' es la única variación frecuente encontrada, ya que existen segmentos que presentan una citosina y segmentos que contienen una uridina en esta posición (Lee, Bae et al. 2003). Se ha propuesto que estos cambios podrían regular los niveles de replicación-transcripción. Los segmentos que codifican las subunidades de la polimerasa contienen en la posición 4 del extremo 3' una C, mientras que la mayoría de los otros segmentos contienen una U (Lee, Bae et al. 2003).

2. LA SEÑAL DE POLIADENILACIÓN

Otra secuencia que comparten todos los vRNAs es una región rica en uracilos, localizada en las posiciones 17 a 21 del extremo 5'UTR, que funciona como señal de poliadenilación (Li & Palese 1994) durante el proceso de transcripción viral.

3. LA REGIÓN ESPECÍFICA DE SEGMENTO

Adyacente a los nucleótidos constituyentes del promotor viral y a la señal de inicio de la traducción en el extremo 3', así como entre la región rica en uracilos y la señal de finalización de la traducción en el extremo 5' del vRNA, se localiza una región específica de segmento de longitud variable, dependiendo del segmento del que se trate.

3.1. Conservación de la región específica de segmento del vRNA

Pese a que durante muchos años ha sido denominada "región no conservada", el análisis de esta secuencia en el virus H3N2 que causó la pandemia de 1962 muestra un grado de conservación muy elevado aunque no total (Furuse & Oshitani 2011). Adicionalmente, un estudio en el que se compararon las secuencias de 506 cepas diferentes, muestra que los nucleótidos de las posiciones 14-16 presentes en el extremo 5'UTR muestran una elevada conservación, excepto para el segmento 6. Del mismo modo, los nucleótidos localizados en las posiciones 12-20 del extremo 3'UTR están altamente conservados, excepto en los segmentos 4 y 6, donde las

posiciones 15-20 y 13-20, respectivamente, son polimórficas (Suzuki & Kobayashi 2013). De hecho, recientemente, se ha visto que esta variabilidad observada para los segmentos 4 Y 6 es subtipo-específica, excepto para los subtipos H10 y H12, que muestran la misma secuencia (Zhao, Peng et al. 2014).

3.2. Función de la región específica de segmento del vRNA

Aunque la función de la región promotora ha sido estudiada ampliamente, se desconocen aún muchos aspectos de la región específica de segmento y los datos que hay, a menudo son controvertidos.

3.2.1. Modulación de la actividad de la polimerasa

Estudios mutacionales, en los que se realizaron delecciones o intercambios de esta región entre diferentes segmentos, han demostrado la participación de estas secuencias en la modulación de actividad replicativa de la polimerasa (Bergmann & Muster 1996, Zheng, Palese et al. 1996, Ng, Li et al. 2008) y, otros estudios apoyan además su participación en la regulación de la actividad transcritiva de los vRNAs (Park &

Katze 1995, Bergmann & Muster 1996, Zheng, Palese et al. 1996, Park, Wilusz et al. 1999).

3.2.2. Participación del empaquetamiento de las vRNPs en los viriones

Desde hace tiempo se sabe que las regiones no codificantes poseen señales de empaquetamiento (Luytjes, Krystal et al. 1989) y, estudios más recientes han descrito que esta señal consta de dos zonas de gran importancia: a) una señal de incorporación al virión, localizada en la región específica de segmento y; b) una señal de ordenamiento, en la región codificante, que afecta a la incorporación de segmentos genómicos diferentes al segmento al que pertenece (Goto, Muramoto et al. 2013).

3.2.3. Modulación y activación de la traducción de los mRNAs virales

Por otro lado, se sabe que la síntesis de proteínas virales durante la infección por el virus de la gripe cambia a lo largo del tiempo (Skehel 1973, Inglis, Carroll et al. 1976, Lamb & Choppin 1976, Inglis & Mahy 1979, Shapiro, Gurney et al. 1987) por ejemplo, los mRNAs de NP y NS1 son muy abundantes y se incrementan considerablemente tras la infección, mientras que los mRNAs de PB1,

PB2 y PA se mantienen relativamente bajos durante las primeras horas de la infección. Más tarde, a lo largo del periodo de la infección, tras la replicación del vRNA progenie, los niveles de los mRNAs que codifican HA, NA y M1 aumentan significativamente (Inglis & Mahy 1979, Enami, Fukuda et al. 1985). Sin embargo, aún sigue sin estar claro por qué la expresión de proteínas virales va cambiando durante la infección, aunque cada vez más estudios apoyan la implicación de las regiones específicas de segmento en la modulación y activación traduccional selectiva de los mRNAs virales (Enami, Sato et al. 1994, de la Luna, Fortes et al. 1995, Ma, Liu et al. 2013, Crescenzo-Chaigne, Barbezange et al. 2014).

3.2.4. Modulación del proceso de *splicing*

El segmento 7 produce cuatro transcritos alternativos (mRNA1, mRNA2, mRNA3 y mRNA4) aunque sólo se conoce la función de dos de ellos. El transcrito mRNA1 produce la proteína M1 y, la proteína M2 es generada a partir del transcrito mRNA2. Estudios recientes han mostrado que la incorporación de una sustitución A14U en el extremo 3'UTR del vRNA del segmento M, modifica el sitio

donador de *splicing* consenso del transcrito mRNA3, alterándose así la regulación del *splicing* de este segmento, llevado a cabo por la proteína NS1 (Zheng, Wang et al. 2015).

UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA EL CONTROL EFICAZ DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE

La infección por gripe afecta a la población general causando síntomas severos entre los que se incluyen fiebre alta, dolor de cabeza, postración y dolor muscular. Además, puede provocar que el individuo infectado sea más susceptible a infecciones virales o bacterianas del tracto respiratorio inferior ocasionando neumonía. En individuos que conforman población de riesgo (mayores de 65 años o menores de 2 años, mujeres embarazadas, personas con obesidad...) la infección por gripe puede resultar fatal, provocando septicemia y fallo multiorgánico.

Aunque son muchos los esfuerzos realizados para el desarrollo de vacunas y antivirales efectivos, la enorme capacidad de variación del virus, su alta transmisibilidad, así como su alta capacidad de salto “interespecie” debido a su amplio rango de hospedador, hacen que el control eficaz de la infección por el virus de la gripe sea de gran dificultad.

1. ANTIVIRALES DISPONIBLES CONTRA EL VIRUS DE LA GRIPE

Para combatir al virus, actualmente se dispone de cuatro tipos de antivirales clasificados en adamantanos (*Amantadina* y la *Rimantadina*) e inhibidores de la NA (*Oseltamivir* y *Zanamivir*).

Los **adamantanos** bloquean la actividad canal iónico de la proteína M2 (Pinto & Lamb 2007). Están prácticamente en desuso debido a que las cepas circulantes de *Influenzavirus A* han sustituido el aminoácido serina por asparragina en la posición 31 de la proteína M2 y se han hecho resistentes (Bright, Medina et al. 2005, Bright, Shay et al. 2006). Además estos antivirales no son efectivos contra *Influenzavirus B*.

Los **inhibidores de la NA** son análogos de ácido siálico, por lo que su mecanismo de acción consiste en bloquear el sitio activo de la NA (McKimm-Breschkin 2013). El de mayor uso es el *Oseltamivir* dado que puede ser utilizado en niños de entre 1 y 6 años sin embargo, se ha descrito un aumento en la aparición de virus resistentes a este fármaco en los años 2007 y 2008 (Meijer, Lackenby

et al. 2009). Estos hechos hacen que sea esencial el desarrollo de nuevos antivirales.

2. APTÁMEROS: UNA NUEVA HERRAMIENTA TERAPEÚTICA

Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla, capaces de reconocer de forma estable, con alta afinidad y de forma específica una molécula diana debido a la estructura secundaria que adoptan. De este modo, la unión del aptámero a la diana se produce por una combinación de interacciones intermoleculares como pueden ser la complementariedad de bases, interacciones electrostáticas, fuerzas de *van der Waals*, y puentes de hidrógeno (Hermann & Patel 2000).

Cada oligonucleótido comprende una región central de secuencia aleatoria de 20-80 nucleótidos de longitud, flanqueada por dos regiones de secuencia conocida, que servirán de unión de los cebadores en los pasos de amplificación durante la selección. Ésta se produce mediante un mecanismo de selección molecular *in vitro*, denominado SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*) (Green, Ellington et al. 1990,

Robertson & Joyce 1990, Tuerk & Gold 1990), que consiste en la identificación de aptámeros con una alta afinidad por un ligando, a partir de librerías complejas de oligonucleótidos obtenidas por síntesis química.

Debido a sus características biológicas y químicas (tamaño pequeño, gran estabilidad, ausencia de inmunogenicidad, facilidad de síntesis química, modificables, etc), los aptámeros están siendo utilizados como agentes para terapias dirigidas y para el diagnóstico molecular. Un claro ejemplo del éxito de estas moléculas en el tratamiento terapéutico, es el compuesto Macugen® (de *Eyetech Pharmaceuticals, Inc., New York, NY, USA*), un aptámero que se une e inhibe la isoforma del factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF implicada en la degeneración macular relacionada con la edad, reduciendo el crecimiento patológico de ciertos vasos sanguíneos.

Dadas las perspectivas terapéuticas que ofrece la utilización de aptámeros, nos planteamos su uso como herramienta para tratar de controlar la infección por el virus de la gripe.

3. LA TRADUCCIÓN DE LOS mRNAs VIRALES COMO POSIBLE DIANA ANTIVIRAL

La traducción de proteínas es un proceso altamente regulado por el que la información genética, contenida en los tripletes de ribonucleótidos del mRNA, se decodifica en una secuencia de aminoácidos para dar lugar a las proteínas. La síntesis de proteínas se divide en tres etapas denominadas iniciación, elongación o polimerización y terminación.

La iniciación de la traducción es el mecanismo molecular por el que los mRNAs se ponen en contacto con la maquinaria ribosomal, que va a llevar a cabo la síntesis de proteínas en el citosol de la célula. Es la más regulada de las tres fases (Pain 1996) y requiere de la participación de una serie de factores proteicos, conocidos como factores de iniciación de la traducción (eIFs, de *Eukaryotic Initiation Factors*). Los eIFs actúan de puente entre el mRNA y la subunidad menor del ribosoma, facilitando el reconocimiento del codón de iniciación y su ensamblaje con la subunidad mayor para formar el ribosoma completo. Además, este complejo proceso está estrechamente regulado, principalmente por

modulación de la actividad de determinados eIFs (Ling, Morley et al. 2005, Richter & Sonenberg 2005, Wek, Jiang et al. 2006).

3.1. La traducción de proteínas en eucariotas

La estrategia más común para la iniciación de la traducción en los organismos eucariotas es la traducción *cap*-dependiente (**Fig. 17**). Los mRNAs celulares presentan en su extremo 5' una estructura m⁷GpppN (*cap*), próxima al codón de iniciación, que es reconocida por el factor de iniciación eIF4F (Gingras, Raught et al. 1999). Este factor es un complejo formado por tres proteínas: **eIF4E**, el factor celular de unión a *cap*; **eIF4A**, una helicasa de RNA responsable de la eliminación de las estructuras secundarias cerca del extremo

5' de los mRNAs; y **eIF4G**, que funciona de nexo entre varios factores tales como eIF3, la proteína de unión a poli(A) 1 (hPABP1), eIF4E y eIF4A. Una vez el complejo eIF4F se ha unido al extremo 5'*cap*, el complejo de pre-iniciación 43S es reclutado hasta los mRNAs, a través de la interacción entre eIF4G y eIF3, permitiendo la traducción eficaz del mRNA (Merrick & Hershey 1996, Sonenberg & Dever 2003, Richter & Sonenberg 2005).

3.2. La traducción de proteínas en el virus de la gripe

Los virus no poseen la compleja maquinaria necesaria para traducir sus mRNAs, y se ven obligados a competir por los factores de la célula huésped y manipular la maquinaria traduccional para reclutarla hasta sus propios

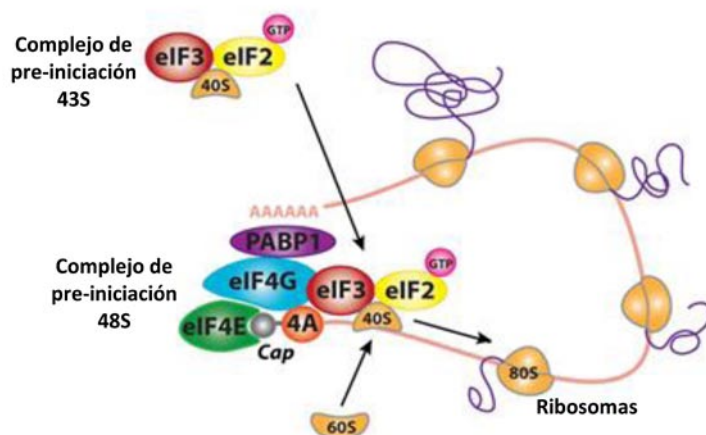


Figura 17. Modelo de la iniciación de la traducción *cap* dependiente. Se muestran los componentes del complejo eIF4F (eIF4E en verde, eIF4G en azul y eIF4A en naranja), así como la proteína de unión a poli(A) (hPABP1 en morado) y el factor eIF3 (en rojo) unidos al factor eIF4G. La línea rosa representa el mRNA con estructura *cap* (en gris), asociado con los ribosomas reclutados (representados en naranja) (Adaptado de Yanguez & Nieto 2011).

mRNAs. Las interacciones entre diferentes proteínas virales con los componentes del complejo eIF4F, así como con los mRNAs virales, permiten la traducción selectiva de proteínas virales junto con el bloqueo de la síntesis de proteínas de la célula infectada (Belsham & Sonenberg 2000, Pe'ery & Mathews 2000, Bushell & Sarnow 2002). Además, la región específica de segmento de las UTRs de los mRNAs del virus de la gripe, modula el grado de estimulación de la síntesis de cada proteína viral (Enami, Sato et al. 1994, de la Luna, Fortes et al. 1995) así como el patrón temporal de traducción de cada uno de los mRNAs virales a lo largo del tiempo de infección (Yamanaka, Ishihama et al. 1988, Yamanaka, Nagata et al. 1991). De este modo, la interacción específica de proteínas celulares y virales con los mRNAs virales, es clave para la iniciación traduccional selectiva de los mRNAs virales y podría constituir una posible diana antiviral.

3.2.1. Factores celulares que interaccionan con la región 5'UTR de los mRNAs virales

La regulación de la traducción viral puede darse a través de la interacción del extremo 5'UTR de los mRNA virales con diferentes

proteínas celulares. Entre las proteínas celulares propuestas, la proteína GRSF-1 es la mejor caracterizada. Se ha descrito que la unión de esta proteína con la región 5' del mRNA viral provoca un aumento de su traducibilidad (Park, Wilusz et al. 1999). Además, trabajos de nuestro laboratorio, han demostrado que la traducción de los mRNAs virales se produce en condiciones en las que se reduce la disponibilidad del factor de iniciación eIF4E (Burgui, Yanguéz et al. 2007). Este proceso podría estar regulado por secuencias en *cis* que confieran al mRNA viral una ventaja selectiva, así como de proteínas accesorias que permitan diferenciar y seleccionar los mRNAs virales de entre el conjunto de los mRNAs presentes en el citoplasma de la célula infectada.

3.2.2. Factores virales que interaccionan con la región 5'UTR de los mRNAs virales

Las proteínas virales mejor caracterizadas que se sabe que están implicadas en la traducción de los mRNAs del virus de la gripe son la proteína NS1 y el complejo de la polimerasa viral.

a) La proteína viral NS1 como factor

regulador de la traducción de mRNAs virales

Aunque NS1 se trata de una proteína multifuncional gracias a su capacidad de establecer interacciones con diferentes tipos de RNAs y proteínas (Hale, Randall et al. 2008), esta memoria se centra en el hecho de que NS1 tiene un papel fundamental en el metabolismo de los mRNAs, cooperando a la casi exclusividad de la traducción de mRNAs virales durante la infección, mediante su interacción con el extremo 5'UTR de éstos (Enami, Sato et al. 1994, de la Luna, Fortes et al. 1995, Park & Katze 1995), así como con diferentes factores celulares importantes para la modulación de la traducción de mRNAs, tales como eIF4GI (Aragon, de la Luna et al. 2000), hPABP1 (Burgui, Aragon et al. 2003) y la proteína Staufen (Falcon, Fortes et al. 1999).

- Interacción entre la proteína viral NS1 y el factor celular eIF4GI

Dentro del complejo eIF4F, clave en la regulación de la iniciación de la traducción celular en eucariotas a través de su interacción con el extremo 5' del mRNA, la proteína eIF4GI actúa como puente, coordinando la interacción entre otras muchas proteínas.

Análisis *in vivo* e *in vitro* han demostrado que NS1 interacciona a través de sus aminoácidos 81-101 con el factor eIF4GI (**Fig. I8**) de forma directa e independiente de RNA (Burgui, Aragon et al. 2003) y los aminoácidos 157-550 de eIF4GI son suficientes para dicha asociación (Aragon, de la Luna et al. 2000). Parece que esta interacción simultánea entre NS1, eIF4GI y el extremo 5'UTR de los mRNAs virales, podría estar facilitando el reclutamiento ribosomal y favorecer así la traducción de mRNAs virales, especialmente aquéllos que se expresan a tiempos tardíos de la infección (Enami, Sato et al. 1994).

- Interacción de la proteína viral NS1 y la proteína celular hPABP1

La proteína hPABP1 también puede ser considerada como parte del complejo de iniciación de la traducción, ya que mediante su interacción con la cola de poliadeninas de los mRNAs y con la proteína eIF4G provoca la circularización de los mRNAs (Tarun & Sachs 1996, Imataka, Gradi et al. 1998, Wells, Hillner et al. 1998) estimulando la iniciación de la traducción de éstos (Gallie 1991).

Mediante estudios de delección, se ha

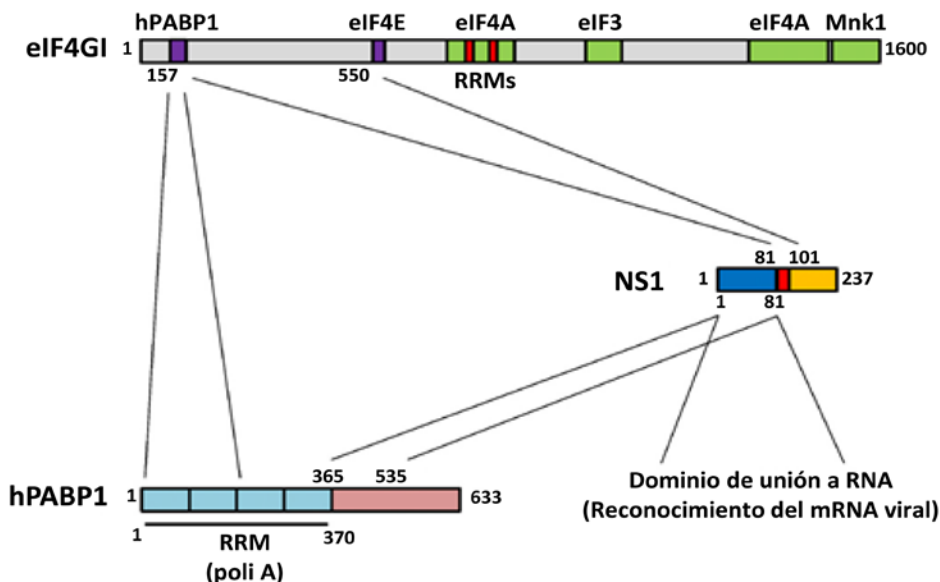


Figura I8. Mapeo de los dominios de unión entre hPABP1, NS1 y eIF4GI. Los sitios de unión de las tres proteínas no son solapantes. NS1 interacciona con eIF4GI a través de sus residuos 81-101 y, con hPABP1 a través de sus residuos 1-81. eIF4GI interacciona con NS1 a través de los residuos 157-550 y con hPABP1 a través de los residuos 172-200. Finalmente hPABP1 interacciona con NS1 a través de los residuos 365-535 y con eIF4GI a través de los residuos 1-175 (Adaptado de Yanguéz & Nieto 2011).

determinado que hPABP1 interacciona con NS1 a través de los residuos 365-535 de hPABP1 y a través de los residuos 1-81 de NS1 (**Fig. I8**) (Burgui, Aragon et al. 2003). Estos datos sugieren que las interacciones entre NS1, eIF4G y hPABP1 son compatibles. De hecho, la interacción entre eIF4G1 y hPABP1, que facilita el inicio de la traducción, podría verse favorecida por la interacción de ambos factores con NS1 durante la traducción de proteínas virales. Además, la interacción de NS1 con mRNAs fundamentalmente virales apoya la idea de que NS1, a través de su interacción con eIF4G y hPABP1, podría

promover la traducción viral (Burgui, Aragon et al. 2003). De este modo, los mRNAs virales se asociarían eficientemente con los complejos de iniciación de la traducción a través de la interacción de NS1 con la región 5'UTR de los mRNAs virales y con las proteínas hPABP1 y eIF4G, reclutando eficientemente al ribosoma sobre el extremo 5'UTR del mRNA viral (de la Luna, Fortes et al. 1995).

- Interacción entre la proteína viral NS1 y la proteína celular hStaufen (hStau1)

La proteína hStaufen es el homólogo humano de la proteína Staufen presente en *Drosophila melanogaster*, donde es esencial

para la localización de ciertos mRNAs que definen el eje dorsoventral en el oocito de la mosca (Neuman-Silberberg & Schupbach 1994). La proteína hStau1 se encuentra asociada a los polisomas, se localiza en gránulos de RNA a lo largo de las dendritas de neuronas en cultivo (Marion, Fortes et al. 1999, Villace, Marion et al. 2004) y se le relaciona con el transporte y la traducción localizada de mRNAs (Villace, Marion et al. 2004). Aunque no se conoce el papel exacto de hStau1 en la modulación de la traducción de los mRNAs del virus de la gripe, los datos sugieren que la interacción de NS1 con hStau podría dar lugar a una asociación más eficiente de mRNAs virales

con los polisomas (de Lucas, Peredo et al. 2010)

b) Implicación de la polimerasa viral en la traducción preferencial de mRNAs virales

Diferentes estudios muestran que la polimerasa viral interacciona con la estructura *cap* y la secuencia 5'UTR de los mRNAs virales, reemplazando la función de eIF4E (Yanguez, Rodriguez et al. 2012), incluso en ausencia de NS1 (Burgui, Yanguez et al. 2007) (**Fig. I9**). Por otra parte, la asociación de la polimerasa viral a través de la subunidad PB2, con el factor eIF4G1 puede estar implicada en la traducción preferencial de los mRNAs virales durante la infección (Yanguez, Rodriguez et al. 2012).

Desde el primer aislado (Smith, Andrewes

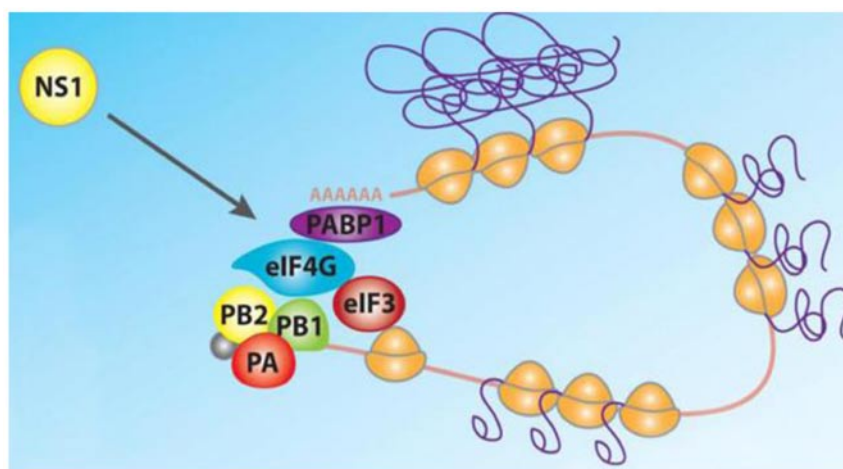


Figura I9. Modelo de la traducción del mRNA viral. Los transcritos virales generados en el núcleo se transportan al citoplasma con la polimerasa unida. Esta situación evita la unión de eIF4E, permitiendo el reclutamiento de los complejos de iniciación de la traducción a través de la capacidad de unión eIF4G1 de la polimerasa. Además, la interacción de NS1 con eIF4G1 y hPABP1 podría ayudar a la formación de un “circuit cerrado” entre los extremos 5' y 3' del mRNA viral cooperando activamente para reclutar los complejos de iniciación de la traducción (Adaptado de Yanguez & Nieto 2011).

et al. 1933) hasta nuestros días se han realizado multitud de estudios con el objetivo de profundizar en la biología molecular del virus de la gripe, así como tratando de obtener antivirales y vacunas eficaces contra el mismo. Sin embargo, el virus de la gripe sigue siendo considerado uno de los patógenos que más morbilidad y mortalidad ha causado a lo largo de la historia, provocando aún hoy en día epidemias estacionales que causan la muerte de 250000 a 500000 personas al año y pandemias ocasionales mucho más devastadoras.

La alta variabilidad de los virus de la gripe, así como su alta transmisibilidad y su amplio rango de hospedador, dificultan el control eficaz de la infección por el virus de la gripe. Con independencia del riesgo de una pandemia global, la gripe sigue siendo un problema de salud pública importante y conlleva un alto coste socioeconómico.

OBJETIVOS

Los virus de la gripe contienen una información genética limitada y requieren factores de la célula hospedadora para llevar a cabo cada una de las etapas de su ciclo infectivo. Recientemente se ha propuesto usar estos factores celulares como dianas antivirales y así minimizar la aparición de virus resistentes.

Por otro lado, se tiene poca información acerca del papel que tienen las regiones no codificantes en la expresión génica del virus de la gripe. Dada la importancia de estas regiones, la introducción de modificaciones sencillas podrían no solo aportar información sobre la funcionalidad de éstas, sino también afectar directamente al ciclo replicativo del virus de la gripe, proporcionando virus atenuados.

En este contexto se propusieron los siguientes objetivos generales:

- 1. Utilización de aptámeros dirigidos contra la proteína hPABP1 como inhibidores de la replicación del virus de la gripe.**
- 2. Control de la expresión génica del virus de la gripe mediada por modificaciones en la región específica de segmento presente en el extremo 3'UTR del vRNA del segmento 8.**

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS

A549: células epiteliales de carcinoma de pulmón humano (Giard, Aaronson et al. 1973).

HEK293T: células embrionarias de riñón humano (Graham, Smiley et al. 1977).

MDCK (NLB2): células de riñón de perro (Madin & Darby 1958). Obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

2. CEPAS BACTERIANAS

E. Coli DH5α: genotipo *supE44 ΔlacU169* ($\phi 80lacZ\Delta M15$) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*. Cepa utilizada para la amplificación de todos los plásmidos.

E. Coli Rosetta: genotipo $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pLysSRARE (Cam^R). Cepa utilizada para la expresión y purificación de la proteína de fusión GST-PABP y sus mutantes de delección.

Bacterias Ultracompetentes XL10-Gold, del kit comercial de Stratagene: genotipo Tet^r $\Delta(mcrA)183\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte$ [F' *proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r*]. Cepa utilizada para la transformación de los

plásmidos procedentes de las mutagénesis.

3. CEPAS VIRALES

A/Victoria/3/75 (H3N2) (VIC): cepa de gripe humana de campo obtenida del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología.

A/PR/8/34 (H1N1) (PR8): cepa vacunal de gripe humana. Cedida por A. García Sastre (Mount Sinai School of Medicine, New York, USA).

4. PLÁSMIDOS

4.1. Plásmidos para la reconstitución de RNPs virales

pCMVPB1, pCMVPA, pCMVPB2, pCMVNP: plásmidos que contienen los cDNA de las subunidades de la polimerasa y NP de la cepa A/PR/8/34 bajo el promotor de *Citomegalovirus* (CMV), dependiente de la RNA polimerasa II celular. Fueron construidos y cedidos por J. Ortega (Falcon, Marion et al. 2004).

4.2. Plásmidos para el rescate de virus recombinantes

pPOLI-PB1 PR8, pPOLI-PB2 PR8, pPOLI-PA PR8, pPOLI-NP PR8, pPOLI-HA-PR8, pPOLI-NA-PR8, pPOLI-M PR8 y PR8 pPOLI-NS PR8:

plásmidos derivados de la cepa A/PR/8/34 que expresan los vRNAs virales bajo el promotor de la RNA polimerasa I. Fueron cedidos por A. Garcia-Sastre (Schickli, Flandorfer et al. 2001).

4.3. Otros plásmidos

pHH-NS-CAT: plásmido que codifica el vRNA del gen de la Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) en polaridad negativa con los extremos conservados del segmento NS, bajo el promotor de la RNA polimerasa I. Construido y cedido por A. Rodríguez.

pCAGGs-EGFP: plásmido que contiene el cDNA de EGFP bajo el promotor de la β -actina de pollo. De *Addgene* (11160).

pBIC-CAT-IRES FMDV-Luciferasa y pBIC-CAT-IRES HCV-Luciferasa: plásmidos que expresan el gen de luciferasa bajo el IRES de FMDV o HCV, respectivamente. Construidos y cedidos por E. Martínez Salas (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).

5. ANTICUERPOS

hPABP1 (808): el suero policlonal que reconoce hPABP1 (808) fue generado en el laboratorio por inmunización de conejos con GST-hPABP1 (Burgui, Aragon et al. 2003).

eIF4GI (504 y 507): para la detección de eIF4GI se utilizó una mezcla de anticuerpos policlonales de conejo obtenidos por inmunización con péptidos del N-terminal y el C-terminal de eIF4GI (Aragon, de la Luna et al. 2000).

β -tubulina: anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce la subunidad β de la tubulina. Sigma (T8328).

GAPDH: anticuerpo policlonal que reconoce la proteína celular GAPDH, fue adquirido a Abcam (ab9485).

PB2, PA: anticuerpos monoclonales específicos para las subunidades PB2 y PA, respectivamente, que han sido descritos previamente (Barcena, Ochoa et al. 1994) (Ochoa, Barcena et al. 1995).

HA-Victoria(2G10): anticuerpo monoclonal de ratón dirigido frente a un epítipo común a las HA de tipo 3. Fue cedido por J.A. Melero (Lopez, Guillen et al. 1986).

NP: suero policlonal generado por inmunización de conejos con la proteína NP, generado y cedido por N. Zamarreño (Res-Infante, Jorba et al. 2008).

NS1 5395: suero policlonal de conejo

generado frente a la proteína recombinante AG.

His-NS1 purificada a partir de bacteria Todos ellos fueron empleados tanto sin
(Marion, Aragon et al. 1997). conjugar como conjugados con digoxigenina o

NS1 rata 1: suero policlonal de rata con Alexa 488. Fueron suministrados por IBA
generado frente a la proteína recombinante GmbH (Göttingen, Germany).

His-NS1 purificada a partir de bacteria La secuencia de cada uno de los aptámeros
(Garaigorta, Falcon et al. 2005). y sus características de especificidad se

El origen y la dilución de uso de cada resume en la **Tabla M2**

anticuerpo en sus diferentes aplicaciones se
resumen en la **Tabla M1**.

6. APTÁMEROS

ApPABP3, ApPABP7 y ApPABP11: específicamente al ácido siálico y a los residuos
aptámeros que reconocen la proteína PABP1 de N-acetil glucosamina. Fue empleada para
(Guerra-Perez, Ramos et al. 2015). la delimitación de las membranas celulares en

RND40: librería original empleada para el ensayos de inmunofluorescencia y adquirida
SELEX (Guerra-Perez, Ramos et al. 2015). de Thermo Fisher Scientific (W11262).

ApControl: oligonucleótido compuesto La resina **Proteína A-Sefarosa** fue adquirida
por una secuencia de 38 pares de residuos de Sigma.

Tabla M1. Relación de anticuerpos

Anticuerpo	Procedencia	Dilución
hPABP1	Conejo	WB (1:1000)
eIF4G	Conejo	WB (1:2000)
β-tubulina	Ratón	WB (1: 15000)
GAPDH	Conejo	WB (1:5000)
PB2	Ratón	WB (1:100)
PA	Ratón	WB (1:200)
NP	Conejo	WB (1:5000) IF (1:2000)
HA (VIC)	Ratón	IF (1:1000)
NS1 (5395)	Conejo	WB (1:5000)
NS1 (rata)	Rata	IF (1:200)

MÉTODOS

1.MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

1.1. Construcción de los plásmidos con

mutaciones puntuales en el plásmido pHH-

NS- CAT

Se utilizó el kit comercial de mutagénesis dirigida *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* de Stratagene (#210514) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para las PCRs se usaron oligonucleótidos degenerados, cuyas secuencias quedan reflejadas en la **Tabla M3**. Tras la PCR mutagénica, se añadió un paso de fenolización y, una vez generados los doce plásmidos, se secuenciaron con los oligonucleótidos pHH directo y pHH reverso (**Tabla M4**) para confirmar la presencia de las mutaciones introducidas.

Tabla M4. Oligonucleótidos para la secuenciación del plásmido pHH-NS-CAT		
Polaridad	Secuencia (5'→3')	Long. (nts)
Directo	ATCCAATCGCATCGTAAAG	20
Reverso	GGCCGTAATATCCAGCTGAACGG	23

1.2. Construcción de los plásmidos con

mutaciones puntuales en el plásmido pPOLI-

NS para el rescate de virus recombinantes

Para poder rescatar virus que incluyan las mutaciones seleccionadas sobre el segmento NS, se utilizaron el kit comercial de mutagénesis dirigida *QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis* y el kit *QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (#210515) de Stratagene, según las indicaciones del fabricante. Para las PCRs se usaron los oligonucleótidos reflejados en la **Tabla M3**. Nuevamente, se añadió un paso de fenolización y precipitación, posterior a la

Tabla M3. Oligonucleótidos para la mutagénesis de los plásmidos pHH-NS-CAT y pPOL1-NS				
Segmento	Posición	Polaridad	Secuencia	Long. (nt)
NS	15	Directo	GGGGGGGAGCAAAGCAGGGT <u>H</u> ACAAAGACATA	33
		Reverso	TATGTCTT <u>T</u> GTDACCCTGCTTTTGCTCCCCC	33
	16	Directo	GGGGGGGAGCAAAGCAGGGT <u>G</u> BCAAAGACATA	33
		Reverso	TATGTCTT <u>T</u> GVCAACCCTGCTTTTGCTCCCCC	33
	17	Directo	GGGGGGGAGCAAAGCAGGGT <u>G</u> ADAAGACATA	33
		Reverso	TATGTCTT <u>T</u> HTCACCTGCTTTTGCTCCCCC	33
	18	Directo	GGGGGGGAGCAAAGCAGGGT <u>G</u> ACBAAGACATA	33
		Reverso	TATGTCTT <u>V</u> GTCACCCTGCTTTTGCTCCCCC	33

H: cualquier nucleótido excepto G; B: cualquier nucleótido excepto A;
D: cualquier nucleótido excepto C; V: cualquier nucleótido excepto T.

reacción de PCR. Se confirmó la presencia de las mutaciones introducidas en los plásmidos con los oligonucleótidos pPOL directo y pPOL reverso, cuya secuencia queda recogida en la

Tabla M5.

Tabla M5. Oligonucleótidos para la secuenciación del plásmido pPOLI-NS		
Polaridad	Secuencia (5'→3')	Long. (nts)
Directo	GATTCTGATCTCGGCGAAG	20
Reverso	GCCAACAATTGCTCCCTCTT	20

1.3. Aislamiento del RNA total de la célula

El RNA total celular se extrajo usando el reactivo TRIzol de Invitrogen (15596018), siguiendo en todo momento las indicaciones del fabricante. El RNA purificado se resuspendió en agua libre de nucleasas y la absorbancia fue medida a 260 nm en el *NanoDrop ND-1000*. La integridad del RNA fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1.4%, con formaldehído al 4% y diluida en tampón MOPS.

1.4. RT-qPCR para la detección y cuantificación de mRNAs y vRNAs virales

La cuantificación de los mRNAs y vRNAs del segmento NP producto de la transcripción y replicación del virus de la gripe se realizó mediante RT-qPCR. Se partió del RNA extraído

de células infectadas tal y como se describe en el apartado anterior. Con el objetivo de eliminar la posible contaminación por DNA, el RNA total extraído se trató con una versión mejorada de la DNAsal que le confiere un 350 % de actividad catalítica procedente del kit *TURBO DNA-free™Kit* (AM1907) de Ambion,. Se siguieron en todo momento las indicaciones del fabricante para la realización de un tratamiento estricto.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo introduciendo dos modificaciones importantes respecto a una reacción de retrotranscripción convencional con el objetivo de incrementar la especificad de detección del vRNA y mRNA del virus de la gripe, así como para evitar la amplificación de productos de retrotranscripción independientes de oligonucleótido (Kawakami, Watanabe et al. 2011). En primer lugar, la reacción enzimática se produce a mayor temperatura (60°C) y, en segundo lugar el diseño de los oligonucleótidos introduce entre 18 y 20 nucleótidos no específicos de gripe (**Tabla M6**). Dicha reacción se llevó a cabo partiendo de 200 ng de RNA y 10 pmoles

Tabla M6. Secuencia de oligonucleótidos para la detección de RNAs virales por RT-qPCR			
Tipo de RNA	Polaridad	Secuencia	Long.(nts)
vRNA	RT	GGCCGTCATGGTGGCGAATGGAGACTGATGGAGAACGCC	39
	Directo	GGCCGTCATGGTGGCGAAT	19
	Reverso	AGTTCGGTGACATTTGGAT	20
mRNA	RT	CCAGATCGTTCGAGTCGTTTTTTTTTTTTTTTAAATTGTC	44
	Directo	CCAGATCGTTCGAGTCGT	18
	Reverso	TGGTCTTGCACTTCCATCA	20

de oligonucleótido específico del mRNA o del vRNA de NP. Se llevó a un volumen final de 5.5 µl de H₂O DEPC. Se incubó la mezcla 10 minutos a 65°C, 5 minutos a 4°C y después 5 minutos a 60°C. Por otro lado se preparó la mezcla de reacción (5 µl de *First Strand buffer* de *Invitrogen*, 2 µl de 0.1 M de DTT, 1 µl de del inhibidor de RNAsas *RNasin Plus Inhibitor* a 40 U/µl de Promega, 1 µl de *Superscript III* a 50 U/µl de *Invitrogen* y 6.5 µl de trehalosa saturada). Tras incubar la reacción 5 minutos a 60°C, se transfirió la mezcla al tubo con el RNA y el oligonucleótido específico. Se incubó la mezcla 1 hora a 60°C y después 15 minutos a 65°C. De cada 20 µl de reacción se transfirieron 4 µl de cDNA directamente a una placa de PCR de 96 pocillos junto con 10 µl de *Power SYBR green PCR master mix* (4369679) de *Applied Biosystems* y 1 µl de cada oligonucleótido a 10 µM (directo y reverso) (**Tabla M6**). La PCR se llevó a cabo usando el Sistema *PRISM 7500 Sequence* (*Applied Biosystem*) con el

siguiente programa: 1 ciclo de 50°C durante 2 minutos seguido de 1 ciclo de 95°C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, y 60°C durante 1 minuto. El límite de ciclos (Ct) fue determinado con el programa analítico SDS (*Applied Biosystems*). Se usaron diluciones seriadas de cDNA para asegurar que la amplificación tuviera lugar en un rango lineal.

Para verificar que se estuvieran identificando cada una de las especies de RNA viral por separado, se llevaron diferentes controles tanto en el paso de retrotranscripción, como en la qPCR.

a) Controles de la reacción de retrotranscripción:

Cada RT se llevó por duplicado habiendo tratado o no con DNAsa los RNAs, para detectar la posible contaminación por DNA.

Con el objetivo de poder evaluar si se detectan puntos de inicio de retrotranscripción esporádico, se llevaron retrotranscripciones

con los cebadores correspondientes pero sin el RNA.

b) Controles de la reacción de PCR a tiempo real:

Para evaluar la posible detección cruzada de moldes, cada reacción de RT fue amplificada con los cebadores que detectan tanto el mRNA como el vRNA.

Los cebadores específicos de la retrotranscripción, así como los específicos de la qPCR, fueron amplificados sin sus moldes.

Paralelamente, se amplificaron muestras de RNA tratadas y no tratadas con DNAsa, para evaluar cuán eficaz había sido el tratamiento con la DNAsa.

Para la representación de los resultados se calculó la inversa de la ΔC_t , obtenida de restar las C_t s correspondientes a cada muestra problema, menos las C_t s de la muestra de referencia. Finalmente, el resultado se multiplicó por 100 con el objetivo de mejorar la visualización de los resultados.

1.5. **Extension de cebador (“Primer Extension”) para la detección y cuantificación del RNA de las RNPs virales**

Para llevar a cabo la transcripción *in vitro* de las RNPs CAT del virus de la gripe con oligonucleótidos marcados radiactivamente se siguieron las indicaciones de E. Fodor (Robb, Smith et al. 2009).

1.1.1. Marcaje de sondas para la detección de RNAs

Se diseñaron oligonucleótidos sintéticos específicos de las distintas especies de RNA (mRNA, cRNA y vRNA) del gen NS-CAT, cuya secuencia se muestra en la **Tabla M7**. El extremo 5’OH de los oligonucleótidos fue marcado con la polinucleótido kinasa T4 (*New England Biolab*) durante 1 hora a 37°C en el tampón comercial suministrado por el fabricante suplementado con 1 mM DTT, 1 U/μl HPRI (Amersham) y 20 μCi de γ³²P-ATP (400 Ci/mmol) (Taper). Para eliminar los restos de fosfato libre, se utilizaron las columnas del kit

Tabla M7. Oligonucleótidos para la reacción de <i>Primer Extension</i>			
Tipo de RNA	Secuencia	Long. (nts)	Tamaño del amplicón (nt)
vRNA	CGCAAGGCGACAAGGTGCTGA	21	158
mRNA + cRNA	ATGTTCTTTACGATGCGATTGGG	23	98-106 (mRNA)
			89 (cRNA)
5s rRNA	TCCCAGGCGGTCTCCCATCC	20	62

de Quiagen *Nucleotide Removal Kit*, dejando los oligonucleótidos marcados diluidos en 30 μ l de agua milliQ.

1.1.2. Ensayo de Primer Extension

El RNA celular se mezcló con un exceso del oligonucleótido marcado con ^{32}P . Para confirmar que la reacción estaba totalmente saturada, se hicieron varias curvas de dosis con diferentes cantidades de oligonucleótido y diferentes cantidades de RNA en cada experimento. La mezcla del RNA con los oligonucleótidos se calentó a 95°C durante 3 minutos para lograr la desnaturalización de los moldes, inmediatamente después se incubó en hielo. Mientras tanto, se preparó la mezcla de transcripción [2x *First Strand Buffer* (Invitrogen), 20 mM DTT, 1 mM dNTPs y 50 U *SuperScript II* (Invitrogen)]. Ambas mezclas fueron incubadas por separado a 45°C durante 3 minutos y a continuación, se añadieron 5 μ l de la reacción de transcripción sobre la mezcla del RNA con los oligonucleótidos. La mezcla de reacción se incubó 1 hora a 45°C y posteriormente, para inactivar la enzima se calentó la mezcla 10 minutos a 70°C y se añadieron 8 μ l de tampón de formamida. Los

productos de transcripción se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 7M Urea al 6% en TBE. Se analizó el resultado mediante la exposición de las pantallas a la membrana y la radiactividad se detectó mediante el *phosphoimager* y se cuantificó usando el programa *ImageQuant*. El resultado se expresa en porcentaje de RNA sintetizado *de novo* en cada muestra con respecto a la sintetizada en el control.

1.6. Purificación de RNA de virus presentes en sobrenadantes

Los vRNAs de los virus rescatados, presentes en el sobrenadante de células infectadas, fueron extraídos y aplicados para así, comprobar la introducción de las modificaciones correspondientes en el segmento NS. Los viriones, presentes en el sobrenadante, fueron incubados a 37°C durante 1 hora en TNE 0.5 % SDS y proteinasa K (1 μ g/ml). A continuación, se fenolizaron las muestras dos veces y se precipitaron con 2.5 volúmenes de etanol absoluto durante un mínimo de 2 horas a -20°C. Posteriormente, se lavaron los precipitados en dos ocasiones con 2.5 volúmenes de etanol al 75 %, se secaron

suavemente y se resuspendieron en tampón DNAsa (10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1U/μl de HPRI y 50 mM Tris-HCl pH 7.5). Se trataron las muestras con DNAsa libre de RNAsas (1 U/μg DNA) (Roche) a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se volvieron a fenolizar dos veces y se precipitaron con etanol, tal y como se ha descrito anteriormente. Se utilizó la técnica de RT-PCR con la finalidad de obtener el cDNA del segmento NS a partir del RNA aislado de virus. Para ello se utilizó el kit *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche) y oligonucleótidos específicos para amplificar este segmento (Tabla M8), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, se comprobó la incorporación del segmento NS con la mutación correspondiente por secuenciación, empleando los oligonucleótidos de la tabla M5.

1.7. Análisis de los niveles intracelulares de los aptámeros por PCR cuantitativa

Para determinar la cantidad intracelular

de cada uno de los aptámeros, a los distintos tiempos que se detalla en cada ensayo, se lavaron las células 2 veces con PBS completo y se lisaron en agua milliQ. Tras calentar a 90°C durante 10 minutos, los lisados se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos. Los niveles de aptámero por pocillo se determinaron por qPCR utilizando el kit *QUANTIMIX EASY KIT (2x)* de Biotools, añadiendo 0.2 μM de los oligonucleótidos F3 y R3 (Guerra-Perez, Ramos et al. 2015) y 1 μl de lisado total celular.

2. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

2.1. Inmunodetección de proteínas (Western-Blot)

Las proteínas diluidas en tampón de ruptura (0.08 M Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % glicerol, 0.01 % de azul de bromofenol) se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida del porcentaje adecuado para cada experimento y se transfirieron a

Tabla M8. Oligonucleótidos para la amplificación de vRNA viral				
Segmento amplificado	Polaridad	Secuencia (5'→3')	Long. (nts)	Tamaño del amplicón (nts)
NS	Directo	GCAGCAAAAGCAGGGT	16	880
	Reverso	GCGCAGTAGAAACAAGGGT	19	

membranas de nitrocelulosa (*Inmobilon P* Millipore) utilizando el sistema semi-líquido (*Bio-Rad*) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20 %, pH 8.3).

Los filtros se bloquearon con una solución de SAB al 3 % en PBS para posteriormente proceder a su incubación con anticuerpos específicos. Los anticuerpos primarios se prepararon en una solución de PBS 0.1 % SAB con 0.05 % *Tween*20. Se incubaron las membranas durante 1 hora a TA y tras tres lavados con PBS 0.25 % *Tween*20 se incubaron con los anticuerpos secundarios preparados en PBS 0.05 % *Tween*20. Tras tres lavados con PBS 0.25 % *Tween*20 se procedió al análisis de la señal en los filtros, que se detectó mediante reacciones de quimioluminiscencia (*Amersham*).

2.2. Purificación de GST-hPABP1

Para la purificación de la proteína recombinante PABP1 humana fusionada a GST en su extremo amino terminal (hPABP1-GST), así como sus mutantes de delección, se crecieron las bacterias en medio LB con ampicilina (50 µg/ml) durante 16 horas a 37°C

y en agitación. Al día siguiente, se añadió un volumen de 2.5 ml del preinóculo a 50 ml de medio LB con la misma concentración de antibiótico y se incubó a 37°C y en agitación hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.5 y 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. La inducción de la expresión de las proteínas se realizó adicionando IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) (Sigma-Aldrich, EEUU) a una concentración final de 1 mM e incubando 2 horas a 37°C.

Tras la inducción con IPTG, las bacterias se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos a 4°C y, tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron en 1.5 ml de tampón G (PBS, EDTA 1mM, 0.1 % Mercaptoetanol, 0.5 % Triton X-100 e inhibidores de proteasas *Complete* (Roche)). Las bacterias se lisaron mediante sonicación en 8 ciclos con pulsos de 30 segundos, parando 30 segundos en hielo entre cada ciclo. El homogeneizado resultante se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C.

Para la purificación de las proteínas se utilizó la resina glutatión-sefarosa (GenScript, EEUU), que se equilibró con tampón G. Se añadieron

100 μ l de resina al 50 %, a los sobrenadantes correspondientes a las fracciones solubles y se incubaron en agitación durante 2 horas a 4°C. A continuación, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavó la resina 3 veces con 0.5 ml de tampón C (PBS, EDTA 1 mM) en presencia de tritón X-100 al 0.5%. La elución de la proteína se realizó añadiendo a la resina 50 μ l del tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 8.0 y glutatión reducido 10 mM) en agitación durante 10 minutos a TA. Posteriormente se volvió a centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante. Se realizó una electroforesis y posterior tinción con azul de *Coomassie* para comprobar que la purificación se había producido correctamente.

2.3. Efecto de los aptámeros en la unión de hPABP1 a secuencias poli (A)

La actividad de unión a secuencias poli (A) fue ensayada en 200 μ l de tampón de unión (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM DTT, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA y 1 mM PMSF), que contenía 25 μ g de lisados de células HEK293T y 50 μ l de poli (A)-sefrosa (50%) preparada como se describe en (Guerra, Vega-Sendino et

al. 2011). Las muestras se incubaron durante 1 hora a 4°C en ausencia o presencia de 40 pmol del aptámero correspondiente. La resina se lavó tres veces con tampón de unión y las proteínas unidas se eluyeron con tampón de ruptura. La presencia de hPABP1 se determinó por *Western blot* utilizando el anticuerpo específico frente a esta proteína.

2.4. Ensayos de traducción *in vitro*

El efecto de los aptámeros sobre el proceso de traducción de proteínas fue estudiado *in vitro* utilizando un sistema de lisado de reticulocitos de conejo tratado con nucleasas (Promega). Para ello, se usaron 10 μ g/ml de mRNA de luciferasa en ausencia o presencia de 4 μ M del aptámero correspondiente. Se recogieron 5 μ l de muestra a diferentes tiempos de incubación y la expresión de la proteína luciferasa fue determinada midiendo su actividad usando el sistema *Luciferase Assay System* (Promega), según las indicaciones del fabricante.

En los ensayos de traducción *in vitro*, a partir de mRNAs virales, se tomaron 200 μ g/ml de RNA citosólico de células infectadas con la cepa A/PR/8/34 (H1N1) del virus de

la gripe (6 hpi) en ausencia o presencia de 4 μ M de aptámero. Las muestras se resolvieron en geles de acrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes y se expusieron a placas de autoradiografía.

2.5. Ensayos de transcripción/traducción *in vitro*

El efecto de los aptámeros sobre el proceso de traducción dependiente de IRES se estudió utilizando el sistema *TNT®Quick Coupled Transcription/Translation Systems* (Promega). Se utilizaron los plásmidos bicistrónicos pBIC CAT IRES-FMDV-LUCIFERASA y pBIC CAT IRES-HCV-LUCIFERASA, en los que la expresión de la proteína luciferasa es dependiente del IRES de FMDV o de HCV, respectivamente. La reacción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante con 0.5 μ g de los diferentes plásmidos, en ausencia o presencia de 0.8 μ M del aptámero correspondiente.

2.6. Estudios de afinidad mediante *Enzyme-Linked OligoNucleotide Assay* (E.L.O.N.A)

Se utilizaron placas de 96 pocillos a las que se añadieron 500 ng/pocillo de proteína recombinante hPABP1-GST. Las placas se

incubaron durante 16 horas a 4°C para facilitar el pegado de la proteína y, posteriormente, se bloquearon con tampón de selección (Guerra-Perez, Ramos et al. 2015) durante 1 hora a 37°C. Los aptámeros seleccionados marcados con digoxigenina en su extremo 5' se diluyeron en tampón de selección (sin SAB) a varias concentraciones (1-80 nM), se desnaturalizaron durante 10 minutos a 95°C y se enfriaron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de los aptámeros (0-80 nM) a cada pocillo de la placa, se incubaron a 37°C durante 1 hora y se lavaron cuatro veces con tampón de selección para eliminar las moléculas de ssDNA no unidas. A continuación, se añadieron 200 μ L de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa (POD) (Roche) diluido 1/1000, se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación, se lavaron 4 veces con tampón de selección y se revelaron usando ABTS (Boehringer-Mannheim) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los valores de absorbancia a 405 nm se midieron utilizando un lector de placas de TECAN.

2.7. Mapeo de la zona de interacción entre hPABP1 y los aptámeros

La identificación de las regiones de la proteína PABP1 humana reconocidas por los aptámeros fue realizada usando diferentes mutantes de delección en los extremos carboxi- y amino- terminales de la proteína recombinante GST-hPABP1 (Burgui, Aragon et al. 2003). La proteína recombinante GST-hPABP1 y sus diferentes mutantes, fueron expresados en bacterias *E. coli Rosetta* que habían sido transformadas con los plásmidos pGEX-2T, pGEX-2T-PABP1, pGEX-2T-PABP1 Δ 1-307, pGEX-2T-PABP1 319, pGEX-2T-PABP1 Δ 1-365, pGEX-2T-PABP1 234 y pGEX-2T-PABP1 Δ 1-535. Las proteínas se purificaron utilizando una resina glutation-Sefarosa como se indicó anteriormente. Cada proteína (2.5 pmoles/pocillo) se incubó con 40 nM de los aptámeros marcados con digoxigenina a 37°C durante 1 hora y se realizó un ensayo ELONA idéntico al mostrado en el punto anterior.

2.8. Marcaje metabólico *in vivo* de proteínas celulares y virales

La detección y cuantificación de la traducción de proteínas celulares y virales

se realizó mediante marcajes metabólico *in vivo*, según el protocolo previamente descrito (Zürcher et al, 2000). Brevemente, las células A549 fueron transfectadas con la cantidad de aptámero requerida en cada experimento, empleando el transfectante *JetPRIME* (Polyplus). Tras 12 horas, se pseudoinfectaron o infectaron a alta MDI (2 ufp/célula) con la cepa PR8 del virus de la gripe, después de 7 horas de infección, se lavaron las células con PBSc y se incubaron durante 1 hora en medio DMEM carente de metionina y cisteína. A continuación, se trataron las células durante 1 hora con el mismo medio suplementado con Met/Cys ^{35}S (50 $\mu\text{Ci/ml}$). Tras el marcaje, se lavaron las células en tampón PBSc y se recogieron directamente en tampón de ruptura para su análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Los resultados obtenidos se analizaron por autorradiografía y posterior cuantificación de la expresión de la proteína viral NP (en las células infectadas) o del carril completo (en las células pseudo-infectadas) empleando el programa *ImageJ*. Paralelamente, se expusieron pantallas a las membranas y la radiactividad se detectó

mediante *phosphoimager* y se cuantificó usando el programa *ImageQuant*. El resultado se expresa en porcentaje de proteína sintetizada *de novo* en cada muestra con respecto a la sintetizada en el control.

2.9. Ensayo de traducción *in vivo* en células HEK293T

El efecto de los aptámeros sobre el proceso de traducción fue estudiado *in vivo* transfectando células HEK293T con los distintos aptámeros y valorando la incorporación de metionina tritiada (^3H -Met) (GE Healthcare). Las células se transfectaron con 40 pmoles de cada aptámero utilizando *JetPRIME* (según las indicaciones del fabricante). A las 4 horas post-transfección, se añadieron 8 μCi /pocillo de ^3H -Met a cada pocillo y se incubó 1 hora a 37°C. Tras ese tiempo, los células se lavaron a 4°C con 0.25 ml de una disolución de L-metionina (Sigma) (1 mg/ml) en PBS y, posteriormente, con 0.25 ml de PBS. A continuación, las células se lisaron añadiendo a cada pocillo 0.25 ml de tampón de lisis con detergente (Tris-HCl 20 mM, pH 7.6, acetato potásico 10 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM y NP-40 0.25%). Las células se levantaron

mecánicamente y se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C. La proteína presente en el sobrenadante se precipitó en 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % durante 45 minutos y, posteriormente, fue filtrado utilizando filtros de fibra de vidrio GF/C *Whatman*. Los filtros se lavaron 3 veces con 2 ml de TCA al 10 %. La radioactividad retenida en los filtros, correspondiente a las proteínas marcadas, fue medida en un contador de centelleo, después de 2 horas de agitación con 3 ml de líquido de centelleo (OptiPhase HiSafe 3, PerkinElmer). El resultado se expresa en porcentaje de proteína sintetizada *de novo* en cada muestra con respecto a la sintetizada en el control.

2.10. Determinación de la cantidad de proteína CAT mediante *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (E.L.I.S.A.)

Para determinar la concentración de la proteína cloranfenicol acetil transferasa (CAT), correspondiente a la actividad transcritiva y replicativa de las RNPs reconstituidas *in vivo*, se empleó el *kit* comercial de *Roche* (11363727001), y se siguieron en todo momento las instrucciones del fabricante.

2.11. Inmunofluorescencias

Se prepararon cultivos de células A549 sobre cristales de 10 mm de diámetro. Tras su transfección y/o infección, las células se lavaron con PBSc, se fijaron durante 20 minutos con formaldehído al 3 % y se permeabilizaron con 0.5 % Tritón-X-100 durante 5 minutos. Las células se bloquearon con PBS suplementado con 3 % SAB y se incubaron durante 1 hora a TA con los anticuerpos primarios. Tras realizar 3 lavados con PBS se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos durante 1 hora a TA y en oscuridad. La tinción de DNA de los núcleos celulares se realizó con DAPI incluyendo este reactivo junto con los anticuerpos secundarios (**Tabla M1**). Finalmente, las células se lavaron con PBS y las preparaciones se montaron con *ProLong* (*Invitrogen*). En los experimentos indicados, así como para el análisis de ortogonales, las imágenes se analizaron en un microscopio de fluorescencia *Zeiss Axiophot 200* equipado con una unidad confocal *BioRad Radiance 2100*. Se obtuvieron secciones ópticas cada 0.2 o 0.3 μ M utilizando el *software LaserSharp v5.0* (*Biorad*) y las imágenes se procesaron con el

programa *LaserPix v4* (*Biorad*).

2.12 Inmunoprecipitación de eIF4GI y de hPABP1

A partir de extractos de células A549 transfectadas con 140 nM del aptámero correspondiente, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación para analizar la asociación de las diferentes proteínas. Las células A549 se cultivaron en medio DMEM enriquecido con un 10% de SFB, siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Las transfecciones de cultivos subconfluentes de células A549 se llevaron a cabo utilizando el transfectante JetPRIME (Polyplus). Tras 12 horas de transfección, las células fueron transfectadas a alta MDI (2UFP/cel) con la cepa PR8 y los cultivos celulares se incubaron 7 horas a 37°C. Las células se lisaron durante 20 minutos en tampón isotónico (150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl pH 8.5) suplementado con 0.2% *Igepal*, inhibidores de proteasas y 1u/ μ l HPRI. Se emplearon 250 μ l de esta solución por cada 10^7 células. El lisado celular se centrifugó a baja velocidad para eliminar núcleos y células sin romper. El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar

a 10000 rpm para obtener la fracción post-mitocondrial (S30), que se incubó con un suero preinmune, con el suero anti-eIF4GI, o con el suero anti-hPABP1 durante 2 horas a 4°C. Después, se incubaron 1 hora más con una resina de proteína A-Sefarosa (*Sigma*) (Aragon, de la Luna et al. 2000). Los inmunoprecipitados se lavaron 8 veces en tampón isotónico suplementado con 0.2% *Igepal*, inhibidores de proteasas y 1u/μl HPRI y se analizaron por *Western blot*.

3. MANIPULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

3.1. Mantenimiento de cultivos celulares

Las líneas celulares HEK293T y A549 se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y aminoácidos no esenciales. La línea celular MDCK, se cultivó en DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales y con SFB al 5%. Para levantar de la placa de cultivo las líneas celulares A549 y MDCK se utilizó tripsina al 0.25 % (*Sigma* T4665) suplementada con EDTA al 0.02 % mientras que para la línea HEK293T se diluyó

esta solución al 10 % en PBS. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C y con un 5 % de CO₂.

3.2. Transfección de células humanas

Se emplearon tres soluciones de transfección diferentes, según se requirió en cada experimento.

3.2.1. Transfecciones con Fosfato cálcico

La transfección con fosfato cálcico se realizó en cultivos subconfluentes de células HEK293T y A549 según el protocolo descrito previamente (Graham & van der Eb 1973, Wigler, Sweet et al. 1979). Brevemente, para la transfección de $1 \cdot 10^7$ células se mezcló el DNA en 500 μl de CaCl₂ a 250 mM y la mezcla se añadió gota a gota sobre 500 μl de HBS y se incubó durante 1 minuto. Posteriormente se añadió la mezcla sobre el cultivo celular gota a gota y se incubó a 37°C el tiempo requerido en cada experimento.

3.2.2. Transfecciones con Lipofectamina

Para la transfección de $1 \cdot 10^7$ células A549 o HEK293T, se incubaron 15 minutos a TA 50 μl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con medio Optimem hasta un volumen final de 1 ml. Esta preparación se mezcló con otro

volumen de 1 ml de Optimem que contiene el DNA a transfectar, y se incubó durante 15 minutos. Finalmente, se añadió la preparación sobre las células de cultivo con 8 ml de medio DMEM + 5% SFB, agitando suavemente y, se incubaron a 37 °C el tiempo requerido en cada experimento.

3.2.3. Transfecciones con JetPRIME®

La transfección con JetPRIME (Polyplus) se realizó en cultivos subconfluentes de células HEK293TyA549. Se incubaron las proporciones de Buffer y aptámero necesario en cada experimento. Tras agitar fuertemente, en todos los casos se añadieron 2 µl de JetPRIME por cada µg de aptámero a transfectar y se incubó a TA durante 10 minutos. Finalmente, la mezcla de transfección se añadió sobre el cultivo con 400 µl de DMEM suplementado con 5 % de SFB y se incubó durante 4 ó 12 horas, según el experimento, a 37°C.

3.3. Reconstitución de RNPs virales

Se transfectaron cultivos de $2.5 \cdot 10^4$ células HEK293T con una mezcla de plásmidos (3 ng de pCMVPB1, 3 ng de pCMVPB2, 1.5 ng de pCMVPA, 120 ng de pCMVNP y 120 ng del plásmido que codifica el vRNA pHH-NS-

CAT). La mezcla de plásmidos se transfectó mediante coprecipitación con fosfato cálcico tal y como se describe en el apartado anterior. Tras 16 horas, las muestras se recogieron para cuantificar la acumulación de proteína CAT mediante un ensayo ELISA, o bien para la cuantificación de los RNAs virales por *Primer Extension*, según se describió anteriormente.

3.4. Ensayos de viabilidad celular

Para medir la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa se recurrió al método colorimétrico MTT. Para ello, 19 horas después de haber transfectado los aptámeros, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por 100 µL de DMEM suplementado con 10 % SFB y 500 µg/ml de MTT. Se incubó la placa durante 2 horas a 37°C y 5 % CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró el medio y se añadieron 100 µL de la solución de solubilización (0.04 M HCl y 0.1 % Nonidet P-40 diluidos en isopropanol). Se agitó la placa hasta que la solución fuese homogénea y se empleó un lector de placas TECAN a una longitud de onda de 570 nm para cuantificar la intensidad del color en cada pocillo.

4. TÉCNICAS VIROLÓGICAS

4.1. Infecciones con el virus de la gripe

Las infecciones con las distintas cepas del virus de la gripe se realizaron a una multiplicidad de infección (MDI) de 2 UFP/cel (alta multiplicidad) ó 0.01 UFP/cel (baja multiplicidad) según se indique en cada experimento. Todas las infecciones se realizaron sobre monocapas de células confluentes y cultivadas el día anterior. Los inóculos de virus se prepararon en PBSc suplementado con 5 µg/ml de SAB. Se retiró el medio de cultivo de las células, se realizó un lavado con PBSc y se añadió el inóculo viral. Se mantuvo el inóculo durante 1 hora a TA para que tuviera lugar la adsorción. Tras la incubación se retiró el inóculo de virus y se incubaron las células con DMEM. En los experimentos de baja MDI se suplementó el medio con 2.5 µg/ml de tripsina acetilada (Sigma). A continuación se incubaron las células infectadas con virus de la gripe a 37°C. Finalmente, se recogieron los extractos a los tiempos indicados en cada experimento.

4.2. Generación de stocks de virus

Se infectaron monocapas de células

MDCK con $1 \cdot 10^{-5}$ ufp/célula. Tras 36-60 horas de incubación a 37°C y cuando el efecto citopático observado alcanzó el 50 % de la monocapa, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos celulares. Se centrifugaron durante 5 minutos a 2500 rpm y 4°C, para eliminar los restos celulares, Se guardaron congelados en porciones a -80°C.

4.3. Titulación de virus mediante ensayo de placa

Se infectaron monocapas de células MDCK con diluciones decimales seriadas de virus, preparadas en tampón PBSc suplementado con 5 µg/ml de SAB. Los cultivos se incubaron durante aproximadamente 72 horas a 37°C en un medio semisólido que contenía DMEM, 0.7% agar, 1 % DEAE-dextrano y 2.5 µg/ ml de tripsina. Cuando las placas de virus resultaron visibles, las células se fijaron con 10% formaldehído, se tiñeron con una solución de cristal violeta (0.1 % cristal violeta, 20 % metanol) y se hizo un recuento de las placas. Para el cálculo del título viral se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{TÍTULO} = [(\text{N}^{\circ} \text{de placas}) \times (1/\text{Factor dilución})] \times (1/\text{volumen de inóculo vírico (ml)})$$

4.4. Rescate de virus recombinantes

Se utilizó el protocolo descrito (Neumann, Watanabe et al. 1999) pero adaptado y modificado para rescatar la cepa A/PR/8/34 (H1N1). Brevemente, se cotransfectaron células HEK293T con los plásmidos genómicos pPOLI que contienen los cDNAs de los segmentos PB1, PB2, PA, NP, M, NS, HA y NA del virus PR8. Por la actuación de la RNA polimerasa I celular, estos plásmidos dan lugar a los ocho segmentos virales. Además, se cotransfectaron los plásmidos pCMV-PB1, pCMV-PB2, pCMV-PA y pCMV-NP que dan lugar a la expresión de las tres subunidades de la polimerasa viral y NP. Según el mutante deseado se cambió el plásmido pPOLI-NS por el plásmido portador de la mutación deseada. Todas las transfecciones se llevaron a cabo empleando fosfato cálcico. Tras 16 horas a 37°C, las células HEK293T que habían sido previamente transfectadas, se despegaron de la placa con un suave tratamiento con EDTA-tripsina. Estas células se mezclaron en suspensión en una proporción 1:10 con células MDCK y se sembraron de nuevo en placas de cultivo con medio DMEM-10% SFB.

Tras 6 horas de incubación a 37°C, se retiró el medio, se realizó un suave lavado con DMEM sin suero y se añadió medio DMEM nuevo sin suero suplementado con tripsina (2.5 µg/ml). Cuando el efecto citopático fue de alrededor de un 50 %, se recogió el sobrenadante y se tituló como se ha descrito anteriormente. Finalmente, se prepararon *stocks* de trabajo de los respectivos virus recombinantes.

4.5. Curvas de crecimiento

Se infectaron monocapas de células A549, a la MDI especificada en cada experimento y se tomaron alícuotas del sobrenadante a distintos tiempos post-infección. Posteriormente, se analizó la infectividad de dichos sobrenadantes realizando las correspondientes titulaciones. En los experimentos a baja MDI, dicho medio se suplementó con 2.5 µg/ml de tripsina acetilada. En los experimentos para determinar la generación de partículas infecciosas a alta MDI, después de retirar el inóculo tras la hora de adsorción, se realizó un primer lavado de las células con PBSc pH 5.3 con el fin de eliminar las partículas virales que no se hubieran adsorbido.

RESULTADOS

BÚSQUEDA DE UN ANTIVIRAL EFECTIVO PARA CONTROLAR LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE

La periodicidad de las pandemias causadas por el virus de la gripe, su capacidad de propagación, así como la alta transmisibilidad del virus le convierten en un problema de salud pública. Se han generado antivirales para combatir al virus pero éste ha desarrollado resistencia a los diferentes fármacos empleados, por lo que se requiere la identificación de nuevos antivirales para controlar la enfermedad.

Teniendo en cuenta que el virus de la gripe necesita los complejos de la traducción celular para la traducción de sus propios mRNAs, decidimos explorar el uso de aptámeros dirigidos contra un componente de los complejos de la traducción, la proteína hPABP1, ya que esta proteína tiene un papel clave en la traducción de los mRNAs y sus dos isoformas (hPABP1 y hPABP2) no poseen actividad redundante.

1. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE APTÁMEROS QUE RECONOCEN LA PABP1 DE *Leishmania infantum*

Estudios previos (Guerra-Perez, Ramos et al. 2015), han permitido seleccionar y caracterizar tres aptámeros (ApPABP3, ApPABP7 y ApPABP11) capaces de unirse con gran afinidad a la proteína PABP1 de *Leishmania infantum* (LiPABP1).

La proteína LiPABP1 utilizada para la selección de estos aptámeros, contiene la mayor parte de los dominios presentes en las proteínas PABPs de otros organismos, incluida la PABP1 humana (hPABP1) (Guerra, Vega-Sendino et al. 2011). Al igual que la hPABP1, la LiPABP1 no sólo se une eficazmente a la cola de poliadeninas de los mRNAs sino que además, conserva los cuatro motivos de reconocimiento de RNA característicos, así como los motivos altamente conservados RNP1 y RNP2. Por otro lado, en su extremo carboxilo terminal, posee el dominio KITGMLLE descrito también en la hPABP1, implicado en la interacción con proteínas reguladoras, así como con diferentes factores de transcripción.

1.1. Los aptámeros seleccionados contra la LiPABP1, reconocen la hPABP1

Dada la alta homología entre ambas proteínas, se estudió la capacidad de los aptámeros seleccionados contra la LiPABP1 para reconocer la hPABP1 mediante un ensayo ELONA. Para llevar a cabo este análisis, se expresó y purificó la proteína hPABP1 fusionada con GST (Burgui, Aragon et al. 2003) y se realizó un ensayo ELONA en el que se inmovilizaron 500 ng/pocillo de proteína GST-hPABP1 o sólo GST, para controlar la unión inespecífica de los aptámeros a GST. Sobre ella, se añadieron cada uno de los

diferentes aptámeros (10 nM) conjugados con digoxigenina. Como se observa en la **figura R1**, los tres aptámeros específicos de la proteína LiPABP1 (ApPABP3, ApPABP7 y ApPABP11) presentan una absorbancia significativamente mayor, cuando están unidos a la proteína GST-hPABP1 que cuando son incubados con GST. Estos resultados indican que los tres aptámeros son capaces de unirse no sólo a la LiPABP1, sino también a la hPABP1.

1.2. ApPABP11 inhibe la unión de la proteína hPABP1 a poli(A)+

Tal y como indica su propio nombre, las proteínas PABPs se caracterizan por su capacidad de unión a la cola de poliadeninas presentes en el mRNA. Para evaluar el efecto de los aptámeros ApPABP3, ApPABP7 y ApPABP11 sobre esta propiedad se lisaron células HEK293T y, sobre los lisados, se añadieron los diferentes aptámeros. Posteriormente se evaluó, mediante *Western blot* con el correspondiente anticuerpo, la retención de la proteína hPABP1 en una resina de poliA-sefarosa. Como se puede observar en la **figura R2**, de igual modo que ocurre entre la interacción de la proteína LiPABP con

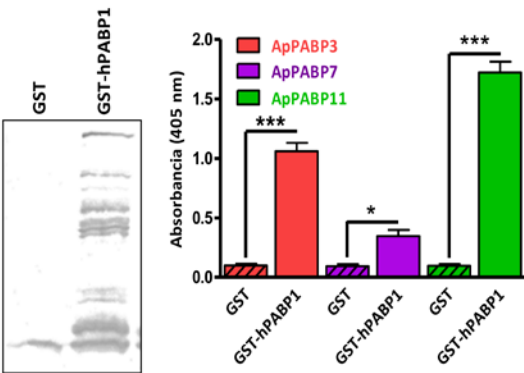


Figura R1. Reconocimiento de la hPABP1 por los aptámeros que reconocen la LiPABP1. A la izquierda se muestra una tinción de *Coomassie* de las proteínas GST o GST-hPABP1 purificadas en *E. coli* y utilizadas en el ensayo ELONA. A la derecha se presenta el ensayo ELONA en el que se inmovilizaron la proteína GST o la proteína recombinante GST-hPABP1, incubándose posteriormente con los aptámeros marcados con digoxigenina. Se añadieron anticuerpos anti-digoxigenina-POD y se revelaron con una solución de ABTS a 405 nm. Las barras representan la media \pm S.E.M. de cuatro experimentos diferentes y la significación estadística fue determinada mediante el test T de *Student*: * $p < 0,05$, *** $p < 0.001$.

la cola de poliA (Guerra-Perez, Ramos et al. 2015), sólo el aptámero ApPABP11 es capaz de interferir la unión entre la proteína hPABP1 y la resina de poliA-sefarosa, provocando una disminución de un 62 % de esta asociación. Por otro lado, los aptámeros ApPABP3 y ApPABP7 no presentan ningún efecto sobre dicha unión, al igual que ocurre con el control inespecífico ApControl, un DNA de cadena sencilla con 38 repeticiones “AG”. Estos resultados sugieren que el aptámero ApPABP11, se une a la proteína hPABP1 en una región diferente a la que lo hacen los aptámeros ApPABP3 y ApPABP7.

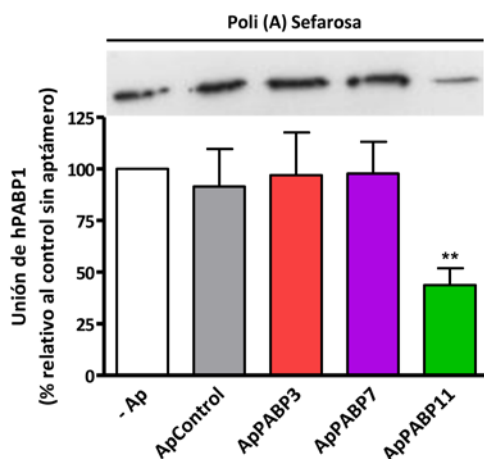


Figura R2. Inhibición de la unión de hPABP1 a la cola de poliadeninas en presencia de los diferentes aptámeros. En la parte de arriba se muestra un Western blot representativo con la cantidad de hPABP1 endógena unida a una columna de poli(A) sefarosa, en presencia o ausencia (-Ap) de los diferentes aptámeros, obtenida a partir de lisados de células HEK293T. En la parte inferior se muestra la cuantificación de hPABP1 obtenida en el Western blot. Los valores fueron normalizados en relación a la cantidad de hPABP1 unido a la resina en ausencia del aptámero. Las barras representan la media \pm S.E.M. de cuatro experimentos diferentes y la significación estadística, determinada mediante el test T de Student es relativa al control sin aptámero: ** $p < 0.01$.

1.3. Efecto de los aptámeros sobre diferentes sistemas de traducción *in vitro*

Teniendo en cuenta que la proteína hPABP1 juega un papel fundamental en la traducción de proteínas, se analizó el efecto de los aptámeros ApPABP3, ApPABP7 y ApPABP11 sobre sistemas de traducción *in vitro* o en sistemas de transcripción acoplado a traducción *in vitro*, en función del molde de partida.

1.3.1. Efecto de los aptámeros sobre la traducción de mRNAs sin estructura *cap* y poliadenilados

En primer lugar, se empleó un mRNA de luciferasa carente de estructura *cap* y poliadenilado, para ser traducidos *in vitro* en ausencia o presencia de una cantidad fija (0.8 μ M) de cada uno de los aptámeros (ApPABP3, ApPABP7, ApPABP11 o ApControl). Los resultados del ensayo (**Fig. R3A**) mostraron que sólo el aptámero ApPABP11 inhibe fuertemente la traducción de este mRNA.

Para averiguar si el efecto inhibitorio del ApPABP11 era dependiente de concentración, se realizó una curva de dosis, empleando concentraciones crecientes del ApPABP11 (0

-4 μM). Como puede observarse en la **figura R3B**, la inhibición traduccional producida por ApPABP11 es dependiente de la dosis empleada.

Finalmente, para descartar posibles efectos inhibitorios sobre el proceso de transcripción, se evaluó el papel de los aptámeros (ApPABP3, ApPABP7 y ApPABP11) en un sistema de transcripción acoplado a

traducción *in vitro* a partir de un plásmido que expresa un mRNA luciferasa, carente de estructura *cap* y poliadenilado. Los resultados obtenidos (no mostrados) fueron idénticos a los recogidos en la **figura R3A**. El que el aptámero ApPABP11 afecte de igual modo a los procesos de transcripción/traducción y traducción, sugiere que el efecto inhibitorio de este aptámero se produce a nivel traduccional, al menos, en condiciones *in vitro*.

1.3.2. ApPABP11 no afecta a la traducción de mRNAs sin estructura *cap* y no poliadenilados

Con el objetivo de ahondar en el estudio del papel que juega la cola de poliadeninas en el proceso inhibitorio observado por el aptámero ApPABP11, se realizaron experimentos adicionales empleando el sistema de transcripción acoplado a traducción. Para ello, se midieron los niveles de traducción de un mRNA de luciferasa, carente de estructura *cap* y del extremo poliadenilado. Como puede apreciarse en la **figura R4**, el ApPABP11 no inhibió la traducción del mRNA de luciferasa que carece de la cola de poli(A), comparado con la inhibición que produce cuando ésta si

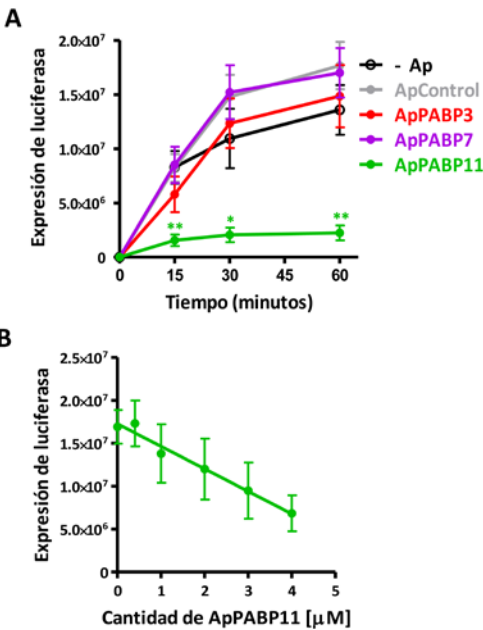


Figura R3. Efecto de los diferentes aptámeros sobre mRNAs carentes de estructura CAP y poliadenilados. Ensayos de traducción *in vitro* empleando un plásmido que expresa el gen de luciferasa sin estructura *cap* y poliadenilado. **A)** El ensayo se realizó en ausencia (-Ap) o presencia de 4 μM de cada aptámero o el control negativo (ApControl). La actividad luciferasa se midió a diferentes tiempos de incubación y los datos representan la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. La significancia estadística, determinada mediante el test T de *Student* es relativa al control sin aptámero: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. **B)** Se repitió el ensayo únicamente con el ApPABP11, añadiendo concentraciones crecientes y midiendo la actividad luciferasa tras 60 minutos de incubación. Los datos representan la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

está presente. Estos resultados indican, que el efecto de este aptámero requiere la presencia de poli(A) en el extremo 3' del mRNA.

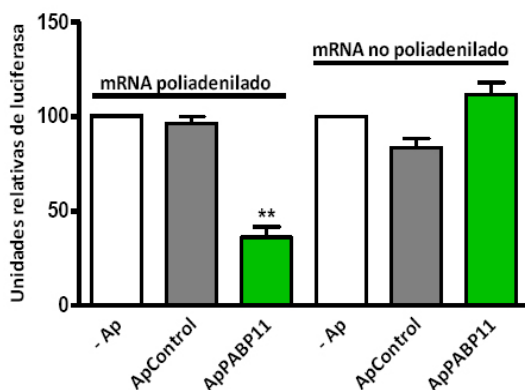


Figura R4. Dependencia de la cola de poliadeninas para el efecto del aptámero ApPABP11. Ensayos de transcripción/traducción *in vitro* empleando como molde plásmidos que expresan el mRNA de luciferasa con estructura cap pero con o sin cola de poliadeninas, en ausencia (-Ap) o presencia de 0.8 μ M de ApPABP11 o de ApControl. Los niveles de luciferasa se midieron después de 60 minutos de incubación. Los datos se expresan como el porcentaje de actividad respecto al control sin aptámero. La significancia estadística, determinada mediante el test T de Student es relativa al control sin aptámero. Se representa la media \pm S.E.M. de cuatro experimentos diferentes. ** $p < 0.01$.

1.3.3. Efecto de los aptámeros sobre la traducción de mRNAs con estructuras cap y poliadenilados

A continuación, con el objetivo de evaluar el efecto de los tres aptámeros sobre la traducción de mRNAs con estructura cap y cola de poliadeninas, se emplearon mRNAs del virus de la gripe para ser traducidos *in vitro* en presencia o ausencia de una cantidad fija de cada aptámero (4 μ M). Como se ha indicado con anterioridad, los mRNAs virales

poseen una estructura cap en su extremo 5' y están poliadenilados en su extremo 3'. Los resultados de dicho estudio (**Fig. R5**) mostraron que, tan sólo el aptámero ApPABP11 inhibe la traducción *in vitro* de mRNAs con estructura cap y poliadenilados.

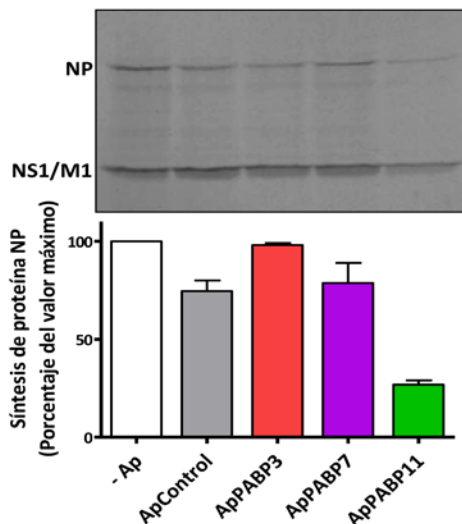


Figura R5. Efecto de los diferentes aptámeros en ensayos de traducción *in vitro* sobre mRNAs 5'cap y 3'poli(A). Ensayos de traducción *in vitro* empleando RNA total procedente de un cultivo de células HEK293T infectadas con la cepa PR8 del virus de la gripe a una MDI de 2 ufp/cel, en ausencia (-Ap) o presencia de 4 μ M de cada aptámero o del control negativo (ApControl). Los extractos celulares se recogieron a 6 hpi y la síntesis de proteínas virales en el ensayo de traducción *in vitro* se midió mediante incorporación de Met-³⁵S tras 60 min de incubación. Los datos representan la media \pm S.E.M de dos experimentos independientes.

1.3.4. Efecto de los aptámeros sobre la traducción IRES dependiente

Finalmente, teniendo en cuenta que la proteína hPABP1 interacciona con el factor de iniciación de la traducción eIF4GI y con la cola de poliadeninas de los mRNAs, puede

ser considerada como un componente del complejo de iniciación de la traducción. Para evaluar si el efecto traduccional que tienen los aptámeros que reconocen la hPABP1 depende de la proteína eIF4GI, se realizaron ensayos de transcripción acoplados a traducción *in vitro* en los que se emplearon plásmidos que expresan RNAs que contienen secuencias en su extremo 5' que corresponden a sitios internos de entrada del ribosoma (IRES), que requieren o no del factor eIF4GI para la estimulación de la traducción del mRNA independiente de *cap*. Por un lado, se empleó un plásmido que expresa el gen de la luciferasa bajo el IRES del virus de la fiebre aftosa (FMDV), que requiere del factor eIF4GI para el ensamblaje de la subunidad ribosomal 40S. Paralelamente, se empleó otro plásmido que expresa el gen de la luciferasa bajo el IRES del virus de la hepatitis C (HCV), que promueve la iniciación en ausencia de eIF4GI. Como se muestra en la **figura R6**, ninguno de los aptámeros inhibe la traducción del mRNA de luciferasa HCV-dependiente, sin embargo, todos ellos excepto el ApControl, inhiben la traducción del mRNA de luciferasa FMDV-dependiente,

siendo el efecto inhibitorio del ApPABP11 considerablemente mayor que el resto. Estos resultados sugieren que los aptámeros dirigidos contra hPABP1 requieren el factor eIF4GI para la inhibición de la traducción *in vitro* de mRNAs.

Cabe señalar que en todos los experimentos realizados *in vitro* se llevó un control negativo adicional correspondiente a la población inicial de aptámeros con la que se realizó el SELEX, el RND40 (Guerra-Perez, Ramos et al. 2015), obteniéndose resultados similares a los mostrados con el control ApControl.

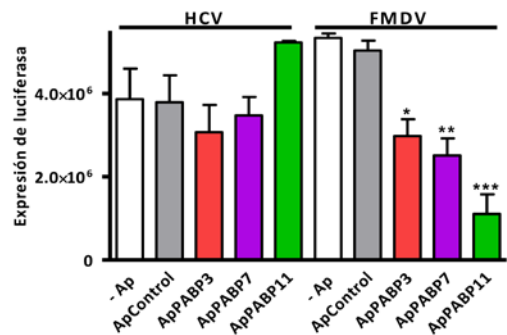


Figura R6. Dependencia del factor eIF4GI para el efecto de los diferentes aptámeros. Se realizaron ensayos de transcripción/traducción *in vitro* empleando plásmidos que codifican el gen de la luciferasa, que contienen sitios internos de entrada del ribosoma (IRES) del virus de la hepatitis C (HCV) o bajo del virus de la fiebre aftosa (FMDV). Las barras representan la media \pm S.E.M. de tres experimentos diferentes y la significación estadística, determinada mediante el test T de Student es relativa al ApControl : * $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

1.4. Efecto sobre la traducción de proteínas celulares *in vivo*

Una vez confirmado el efecto del ApPABP11

en el proceso de traducción *in vitro*, se decidió realizar un estudio preliminar para comprobar si estos aptámeros tenían algún efecto sobre células en cultivo y así determinar su posible utilización como antivirales. Para ello se llevaron a cabo marcajes metabólicos *in vivo* en cultivos de células HEK293T. Dichas células fueron transfectadas con los aptámeros que reconocen la hPABP1 o con el ApControl, a una concentración final de 60 nM. Cuatro horas después del marcaje, se midió la incorporación de la metionina marcada radiactivamente con ^3H . Los resultados muestran una reducción en la síntesis de proteínas celulares de un 55% y 50% en presencia de los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11, respectivamente. Por el contrario, no se detecta ningún efecto en presencia de los aptámeros ApPABP3 y ApControl (**Fig. R7**).

Estos resultados indican que los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11 son capaces de unirse a la hPABP1 e inhibir la traducción de mRNAs celulares en condiciones *in vivo*, es por ello que se decidió continuar con su caracterización, descartándose el aptámero ApPABP3 de este estudio por la ausencia de efecto *in vivo*.

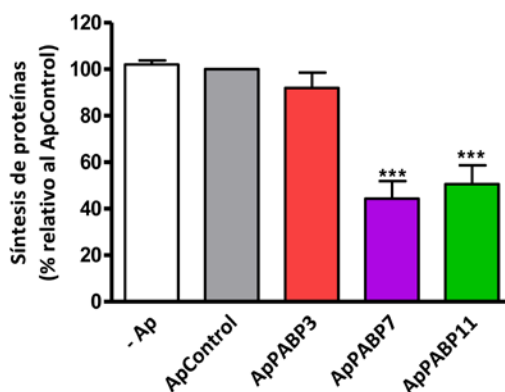


Figura R7. Efecto de los aptámeros en cultivo celular. Células humanas HEK293T fueron transfectadas con los diferentes aptámeros que reconocen la hPABP1 y con el ApControl. A las 4 hpt los cultivos fueron incubados con ^3H -Met durante 1 hora. Tras el marcaje, se analizó la incorporación de Met- ^3H en los extractos totales por electroforesis en geles de poliácridamida y autoradiografía. Fueron cuantificados con el programa Image J. Las barras representan la media \pm S.E.M. de tres experimentos diferentes y la significación estadística, determinada mediante el test T de Student es relativa al ApControl : *** $p < 0.001$.

1.5. Estudio de afinidad de los aptámeros con la proteína hPABP1

Seguidamente se estudiaron las afinidades tanto del ApPABP7 como del ApPABP11 con la proteína GST-hPABP1. Con este objetivo, se llevaron a cabo ensayos ELONA, en los que la proteína GST-hPABP1 (500 ng/pocillo) fue incubada con concentraciones crecientes de cada aptámero (de 0 a 80 nM), estando los aptámeros marcados con digoxigenina. Los datos obtenidos fueron analizados como se describe en Materiales y Métodos, apartado 2.6. Se calculó la constante de disociación (Kd), que corresponde a la concentración de

ligando requerida para alcanzar la mitad del máximo de asociación entre el ligando y su diana. Como puede observarse en la **figura R8**, los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11, detectan la proteína hPABP1 de una manera dependiente de concentración con Kds en el rango de nM (5.29 ± 1.86 nM & 3.92 ± 0.96 nM, respectivamente). El ApPABP7 alcanza un punto máximo de unión (Bmax) significativamente más bajo que ApPABP11 (7734 ± 692 vs. 12367 ± 725). Estos resultados indican que, aunque ambos aptámeros muestran gran afinidad por la hPABP1, la

afinidad de ApPABP11 por esta proteína es mayor que la presentada por ApPABP7.

1.6. Caracterización del sitio de unión de los diferentes aptámeros a la proteína hPABP1

Con el fin de averiguar el sitio de unión de los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11 a la proteína hPBP1, se expresaron y purificaron la proteína GST-hPABP1 completa, así como diferentes mutantes de delección (Burgui, Aragon et al. 2003) (**Figs. R9B y R9C**), y se realizó un ensayo ELONA. Para ello se añadió una cantidad fija de cada mutante de delección o de la proteína GST-hPABP1 completa y, sobre ellos se adicionó una cantidad conocida de cada aptámero conjugado con digoxigenina. Los resultados de este ensayo quedan recogidos en la **figura R9D**. Como se puede apreciar, ambos aptámeros se unen a la proteína GST-hPABP1 completa, y no se unen a la GST sola. Por otro lado, la construcción de GST-hPABP1 que carece de los primeros 307 aminoácidos del extremo aminoterminal ($\Delta 1-307$) es reconocida por ambos aptámeros. Por el contrario, ninguno de ellos es capaz de reconocer los mutantes de delección

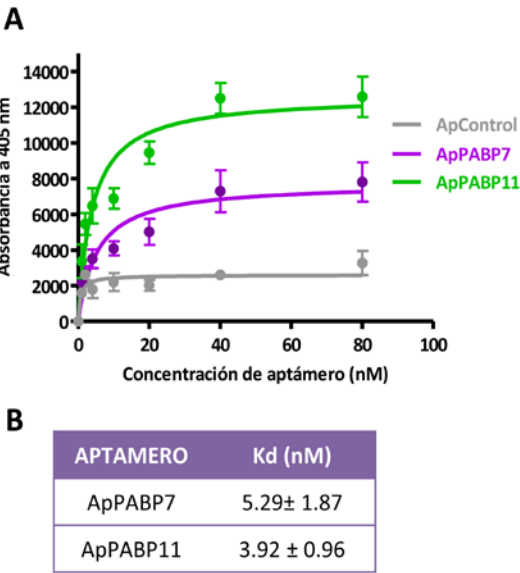


Figura R8. Afinidad por la PABP1 de los aptámeros ApPABP7, ApPABP11 y ApControl. A) Se realizaron ensayos ELONA para determinar la afinidad hPABP1-aptámero. Se inmovilizaron 0.5 µg/pocillo de la proteína GST-hPABP1, y se incubaron con concentraciones crecientes (0-80 nM) de cada aptámero marcado con digoxigenina. Se representa la media ± S.E.M de tres experimentos independientes. **B)** Valor de la Cnstante de disociación (Kd) obtenida para cada aptámero.

que carecen de los primeros 365 ($\Delta 1-365$) 535) (**Fig. R9A**).

ó 535 ($\Delta 1-535$) aminoácidos del extremo

amino terminal. Además, ninguno de los dos

aptámeros se une a la hPABP1 que contiene

los primeros 234 aminoácidos (9-234), pero

reconocen el mutante que posee los primeros

319 aminoácidos de la proteína (9-319). Estos

resultados indican que ambos aptámeros,

ApPABP7 y ApPABP11, interaccionan con la

proteína hPABP1 en una región que reside

entre los aminoácidos 307 y 364, una zona

localizada dentro del dominio RRM4, muy

próxima al sitio de interacción entre la

proteína viral NS1 y la proteína hPABP1 (365-

2. CARACTERIZACIÓN IN VIVO DE APTÁMEROS ApPABP7 Y ApPABP11

Dada la capacidad de los aptámeros

ApPABP7 y ApPABP11 de reconocer a la hPABP1

in vitro y de inhibir la síntesis de proteínas *in*

vivo, se estudió a continuación su efecto en

la línea celular A549. Esta línea celular se

deriva de epitelio de pulmón humano (Giard,

Aaronson et al. 1973), utilizada habitualmente

en las infecciones por el virus de la gripe, y

se considera el modelo más cercano a una

infección por el virus.

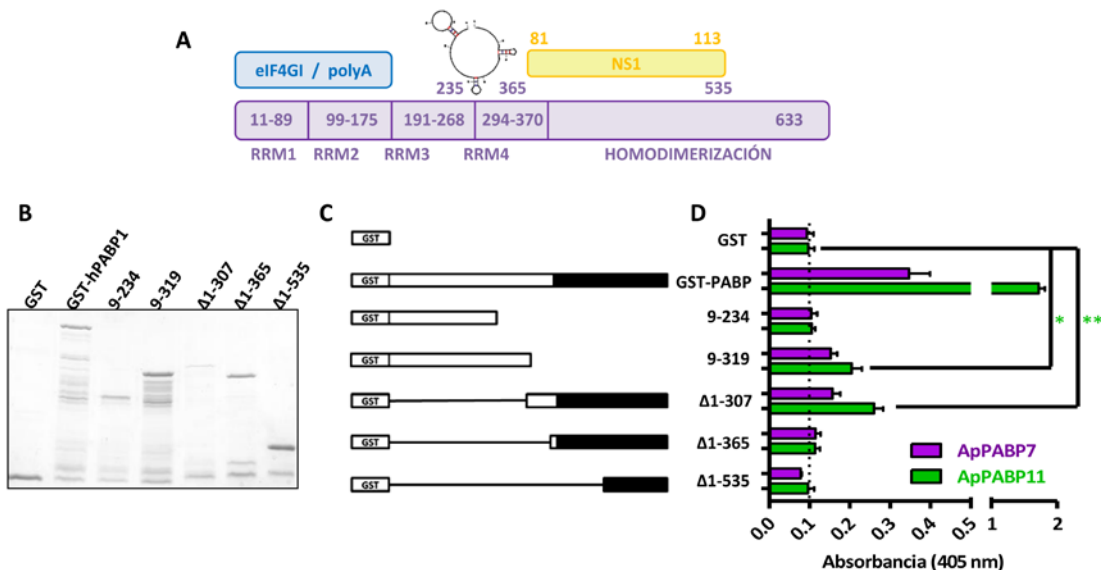


Figura R9. Mapeo del sitio de unión de los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11 a la proteína hPABP1. **A)** Diagrama de hPABP1 con las regiones implicadas en la asociación con el factor eIF4GI, la cola de poliadeninas de los mRNAs, así como con la proteína viral NS1. Se incluyen los 4 motivos de unión a RNA (RRM), así como el sitio de unión de ambos aptámeros. **B)** Tinción de Coomassie de las proteínas GST o GST-hPABP1 purificadas en *E. coli* y utilizadas en el ensayo. **C)** Esquema de los mutantes de delección de hPABP1 fusionados a GST utilizados en el ensayo de interacción *in vitro*. **D)** Ensayo ELONA. La proteína GST, GST-hPABP1 y los diferentes mutantes de delección se sembraron a 2.5 pmol / pocillo, y se incubaron con 10nM de ApPABP7 y ApPABP11, ambos marcados con digoxigenina. Las barras representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes: * $p < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.1. Búsqueda de las condiciones experimentales adecuadas

Primeramente se realizó una búsqueda de las condiciones experimentales óptimas, tales como el transfectante más eficaz, los tiempos más adecuados de actuación, así como la búsqueda de las dosis de aptámeros menos tóxicas para las células.

2.1.1. Búsqueda del transfectante más eficaz

La transfección de células eucariotas consiste en la introducción en ellas de material genético mediante plásmidos, vectores víricos u otras herramientas para la transferencia. Este proceso, generalmente se lleva a cabo abriendo poros transitorios en la membrana plasmática de las células mediante el uso de transfectantes químicos como polímeros (catiónicos), liposomas o nanopartículas. Dado que los resultados que vayamos a obtener, dependerán claramente de la internalización de los aptámeros en las células, se comparó el porcentaje de células A549 transfectadas con cada aptámero y su grado de internalización mediante el uso en paralelo de tres transfectantes diferentes:

a) Fosfato cálcico (Graham & van der Eb 1973): por tratarse de uno de los métodos más económicos, fiables y de uso cotidiano.

b) Lipofectamina 2000® (Invitrogen): Un método muy eficiente basado en la inclusión del DNA en liposomas, también es de uso cotidiano cuando el fosfato cálcico no es eficiente.

c) JetPRIME (Polyplus): la casa comercial no especifica en qué se basa este método, aunque debiera de tratarse de un polímero catiónico. La información comercial indica una gran eficacia y asegura un porcentaje de transfección de las células A549 en torno al 90%.

Para llevar a cabo estos ensayos se emplearon los aptámeros ApControl, ApPABP7 y ApPABP11 conjugados con el fluoróforo Alexa 488, lo que permite caracterizarlos por citometría de flujo y microscopía.

Se transfectaron células A549 con los tres aptámeros mencionados, utilizando los diferentes transfectantes. Posteriormente, se trató de evaluar el porcentaje de transfección a diferentes horas postransfección por

citometría de flujo, pero no fue posible. Por este motivo, se realizó un análisis por microscopía confocal. Las células transfectadas, fueron tratadas con DAPI para detectar los núcleos y con WGA594 para poder distinguir la membrana celular. Los resultados (**Fig. R10A**) mostraron que las células tratadas con Lipofectamina, presentaban una clara alteración de la morfología y la transfección era claramente menos eficiente respecto aquellas que habían sido transfectadas con fosfato cálcico o JetPRIME, que mostraron un porcentaje de transfección próximo al 100%. De este modo, la lipofectamina fue descartada del siguiente estudio. A continuación, para averiguar si los aptámeros estaban siendo internalizados o por el contrario, permanecían adheridos a la membrana celular, se procedió al análisis de la proyección ortogonal de las imágenes. Esta técnica permite obtener una imagen del perfil de la célula, obteniendo una sección de los planos x-z barriendo una línea sencilla en el eje x a través de la muestra a diferentes profundidades del eje z. Con esta técnica pudimos determinar que mientras que con el fosfato cálcico los aptámeros

permanecían anclados a la membrana celular, cuando las células eran transfectadas con JetPRIME los aptámeros eran claramente liberados al interior de la célula (**Fig. R10B**). En las imágenes se presentan los resultados obtenidos para la transfección del ApPABP7, resultados similares fueron obtenidos empleando el ApPABP11 y el ApControl.

2.1.2. Mantenimiento intracelular de los aptámeros a lo largo del tiempo

Para poder determinar la duración de nuestros experimentos, un parámetro a tener en cuenta era el tiempo que los aptámeros se mantenían en el interior de las células. Para ello, células A549 fueron transfectadas con los tres aptámeros conjugados con Alexa 488. A continuación, las células fueron recogidas y fijadas con formaldehído a diferentes horas postransfección. El análisis de las imágenes por microscopía confocal (**Fig. R11A**), así como el estudio de las proyecciones ortogonales de las imágenes (**Fig. R11B**), indicaron que los aptámeros se internalizan a lo largo del tiempo. No obstante, cabe destacar que el fluoróforo Alexa 488 es altamente estable, de tal manera que no se puede descartar

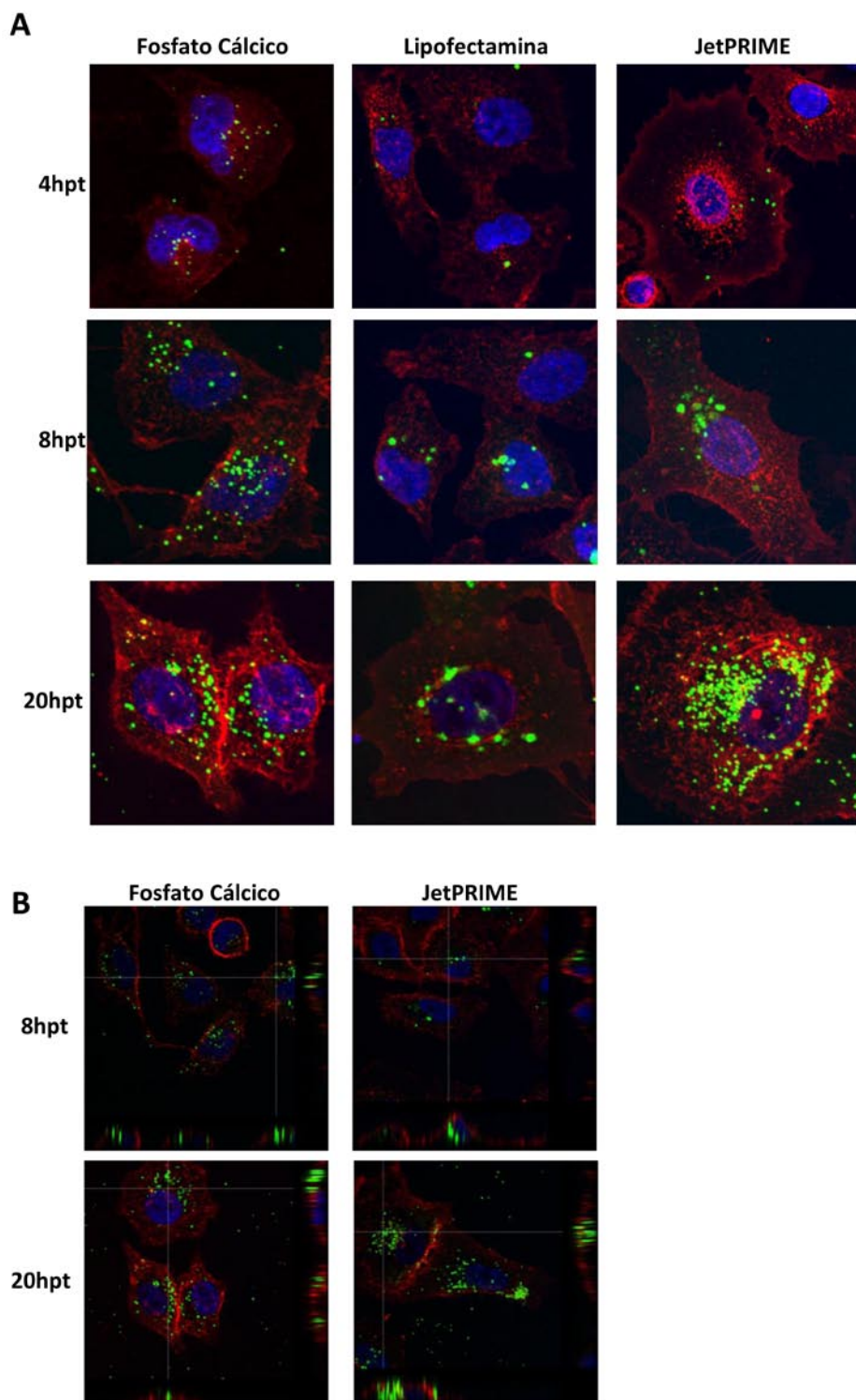


Figura R10. Análisis de la efectividad de diferentes transfectantes. Cultivos de células A549 se transfectaron con 60 nM de cada uno de los aptámeros conjugados con Alexa 488 (ApPABP7, ApPABP11 o ApControl). Los cultivos se fijaron a las horas post-transfección indicadas en cada caso. Las imágenes presentadas son secciones de microscopía confocal representativas que muestran la presencia del núcleo (DAPI en azul), la membrana celular (rojo) y el aptámero ApPABP7 transfectado (verde). **A)** Estudio de la morfología celular. **B)** Análisis de proyecciones ortogonales con los transfectantes más eficaces. Resultados similares fueron obtenidos transfectando el ApPABP11 y el ApControl.

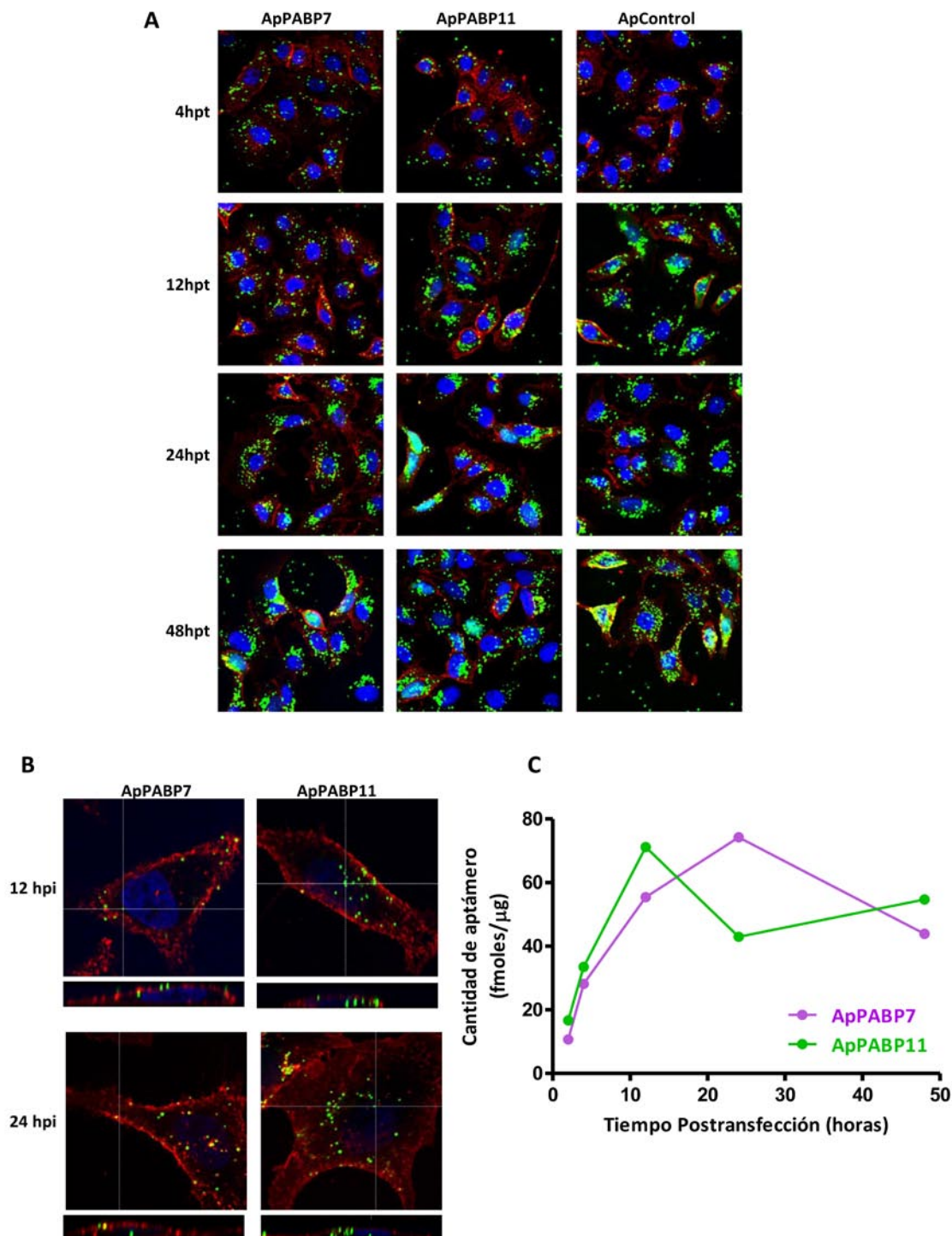


Figura R11. Mantenimiento intracelular de los aptámeros a lo largo del tiempo. A) Se transfectaron cultivos de células humanas A549 con 70 nM de cada uno de los aptámeros conjugados con Alexa Fluor 488 (ApPABP7, ApPABP11 o ApControl) empleando el transfectante JetPRIME. Los cultivos se fijaron a las horas post-transfección indicadas en cada caso. Las imágenes presentadas son secciones de microscopía confocal representativas que muestran la presencia del núcleo (DAPI en azul), la membrana celular (rojo) y el aptámero transfectado (verde). **B)** Análisis de proyecciones ortogonales. **C)** A las horas post-transfección indicadas se recogieron los extractos celulares y se aisló el RNA total celular. La acumulación intracelular de cada aptámero se determinó mediante qPCR.

el hecho de estar detectando el fluoróforo libre y que el aptámero no esté intacto. Para tratar de resolver este hecho, paralelamente, se transfectaron células A549 con los tres aptámeros sin el fluoróforo y se cuantificó por qPCR la cantidad de los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11 que permanecían en el interior celular a lo largo del tiempo. Como puede observarse en la **figura R11C**, la cantidad de aptámero intracelular aumenta a lo largo del tiempo hasta aproximadamente las 12-24 hpt, para luego mantenerse estable, aunque no se puede descartar la pérdida de su estructura tridimensional durante este tiempo.

2.2. Estudio del efecto de los aptámeros sobre la traducción de proteínas celulares y toxicidad celular

A continuación, se estudió la toxicidad de los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11 sobre las células A549, para obtener el parámetro CC_{50} , correspondiente a la concentración de aptámero que provoca la muerte del 50% de las células en cultivo. Para calcular la CC_{50} de ambos, se recurrió al ensayo metabólico de viabilidad MTT (Levitz & Diamond 1985). Se transfectaron células A549 con

concentraciones crecientes (35-1050 nM) del aptámero control (ApControl) o los aptámeros que reconocen la hPABP1 (ApPABP7 y ApPABP11). Se incubaron durante 19 horas y, posteriormente, se calculó el porcentaje de viabilidad celular respecto al cultivo de células sin aptámero. Esta técnica (**Fig. R12A**) no permitió determinar un valor concreto para el parámetro de CC_{50} , ya que la adición de los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11, no produce un daño celular importante, ni siquiera a las concentraciones más altas.

Adicionalmente se realizaron marcajes metabólicos en células A549 transfectadas con concentraciones crecientes (0-700 nM) de cada uno de los aptámeros. Tras 12 horas de transfección las células se lavaron y, 6 horas después, se marcaron metabólicamente con Met-Cys ^{35}S durante 1 hora. La síntesis de proteínas fue evaluada mediante la incorporación de la marca radiactiva utilizando un *PhosphorImager*. Como puede apreciarse en la **figura R12B**, hay una inhibición de la síntesis de proteínas celulares efectiva hasta llegar a la concentración más alta (700 nM). Este resultado confirma, no sólo la ausencia de

toxicidad de los aptámeros a concentraciones, como mínimo de hasta 700 nM, sino que también confirman la inhibición de la síntesis de proteínas celulares.

Dada la imposibilidad de calcular la CC_{50} de los aptámeros y, con el fin de ser lo más conservadores posibles en cuanto a la integridad celular, decidimos tomar como referencia de daño celular los valores de CTI_{50} (concentración de aptámero capaz de provocar una disminución del 50% de la síntesis de proteínas celulares). Como puede observarse (**Fig. R12B**), dicha concentración es de 525 nM y 315 nM para el ApPABP7 y el ApPABP11, respectivamente.

2.3. Estudio del efecto de los aptámeros sobre la traducción de proteínas virales y cálculo de la efectividad de los mismos

Una vez comprobado el efecto inhibitorio de los aptámeros sobre la síntesis de proteínas celulares, se procedió a analizar el efecto de éstos sobre la traducción de proteínas virales. Para ello, como en el caso anterior, las células A549 fueron transfectadas con cantidades crecientes de cada uno de los aptámeros (ApControl, ApPABP7 o ApPABP11). Transcurridas 12 h de transfección, las células se pseudoinfectaron o se infectaron con la cepa PR8 del virus de la gripe a alta MDI. Tras 7 horas, las células se marcaron

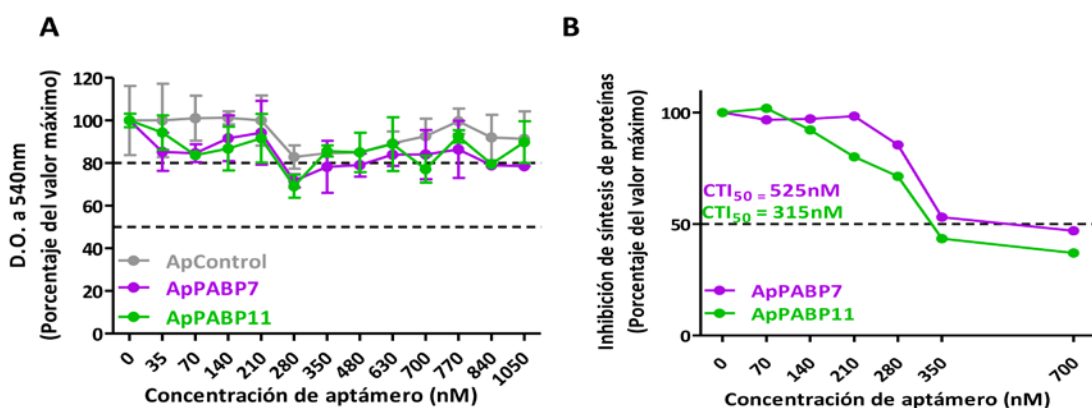


Figura R12. Efecto de los aptámeros en células A549. Monocapas de células A549 fueron transfectadas con concentraciones crecientes de cada uno de los aptámeros correspondientes. **A)** Tras 19 horas de transfección, se evaluó la actividad metabólica de la biomasa celular en un ensayo de viabilidad celular MTT. El experimento se realizó tres veces y se muestra la media \pm S.E.M. **B)** Adicionalmente, para evaluar el efecto de los aptámeros sobre la síntesis de proteínas celulares, a las 19 hpt se realizó un marcaje metabólico con Met-Cys ^{35}S . Se analizaron los extractos totales de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida y *Phosphorimager*, la incorporación de Met-Cys se cuantificó en cada uno de los carriles completos. El experimento se realizó tres veces y se muestra la media de la cuantificación. Esta representación gráfica permitió calcular el parámetro CTI_{50} , que muestra la concentración de aptámero capaz de provocar una disminución del 50% de la síntesis de proteínas celulares.

metabólicamente con Met-Cys ^{35}S durante 1 h y la traducción de proteínas fue evaluada mediante el uso de un *PhosphorImager*. La cuantificación de la síntesis de proteína NP, mostró una importante disminución de la síntesis de proteínas virales dependiente de dosis, en presencia de los aptámeros específicos ApPABP7 y ApPABP11 (**Fig. R13**), siendo el aptámero ApPABP7 particularmente eficaz. A partir de estos datos, se obtuvo el parámetro de la VTI_{50} (concentración de aptámero necesaria para disminuir un 50% la tasa de traducción de proteínas virales)

siendo de 70 nM en el caso de ApPABP7 y de 190 nM para ApPABP11.

La comparación de la capacidad de inhibición de las síntesis de proteínas celulares y virales, recogida en la **figura R14A**, indica que los aptámeros que reconocen la proteína hPABP1 son capaces de reducir la traducción de mRNAs celulares, pero son más eficaces inhibiendo la traducción de mRNAs del virus de la gripe, lo que indica la existencia de una ventana de acción en la que se puede inhibir la traducción de mRNAs virales, sin afectar a la síntesis de proteínas celulares.

La relación entre la inhibición traduccional celular y la viral, nos proporciona el índice de selectividad (I.S.) o índice terapéutico (I.T.) de cada aptámero. Este parámetro refleja la seguridad relativa de un medicamento o su selectividad de acción. El IT del ApPABP7 es de 7.5 y de 1.66 para ApPABP11. La capacidad de inhibición de la síntesis de proteínas virales de ambos aptámeros, en la cepa Victoria (H3N2) fue evaluada en paralelo obteniéndose valores similares para los parámetros de VTI_{50} , y por tanto, también de IT (resultados no mostrados).

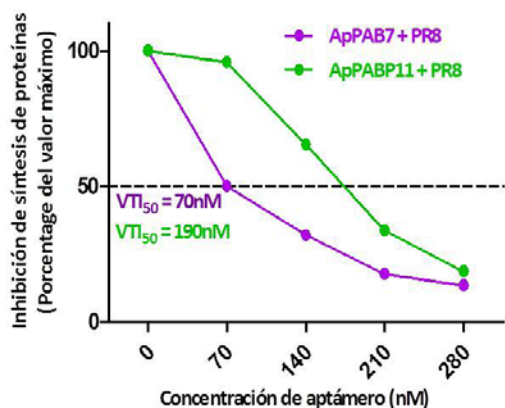


Figura R13. Efecto de los aptámeros en la traducción de los mRNAs virales. Monocapas de células A549 fueron transfectadas con los aptámeros correspondientes, a concentraciones cada vez mayores (0-280 nM). Después de 12 horas de transfección se infectaron con la cepa PR8 a una MDI de 2 ufp/célula. Tras 7 horas, se realizó un marcaje con Met-Cys ^{35}S durante 1 hora. Se analizaron los extractos totales de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida y la incorporación de Met-Cys en la síntesis de NP se cuantificó en cada uno de los casos. La representación gráfica permitió calcular el parámetro VTI_{50} , que muestra la concentración aptámero capaz de provocar una disminución del 50% en la síntesis de proteínas virales.

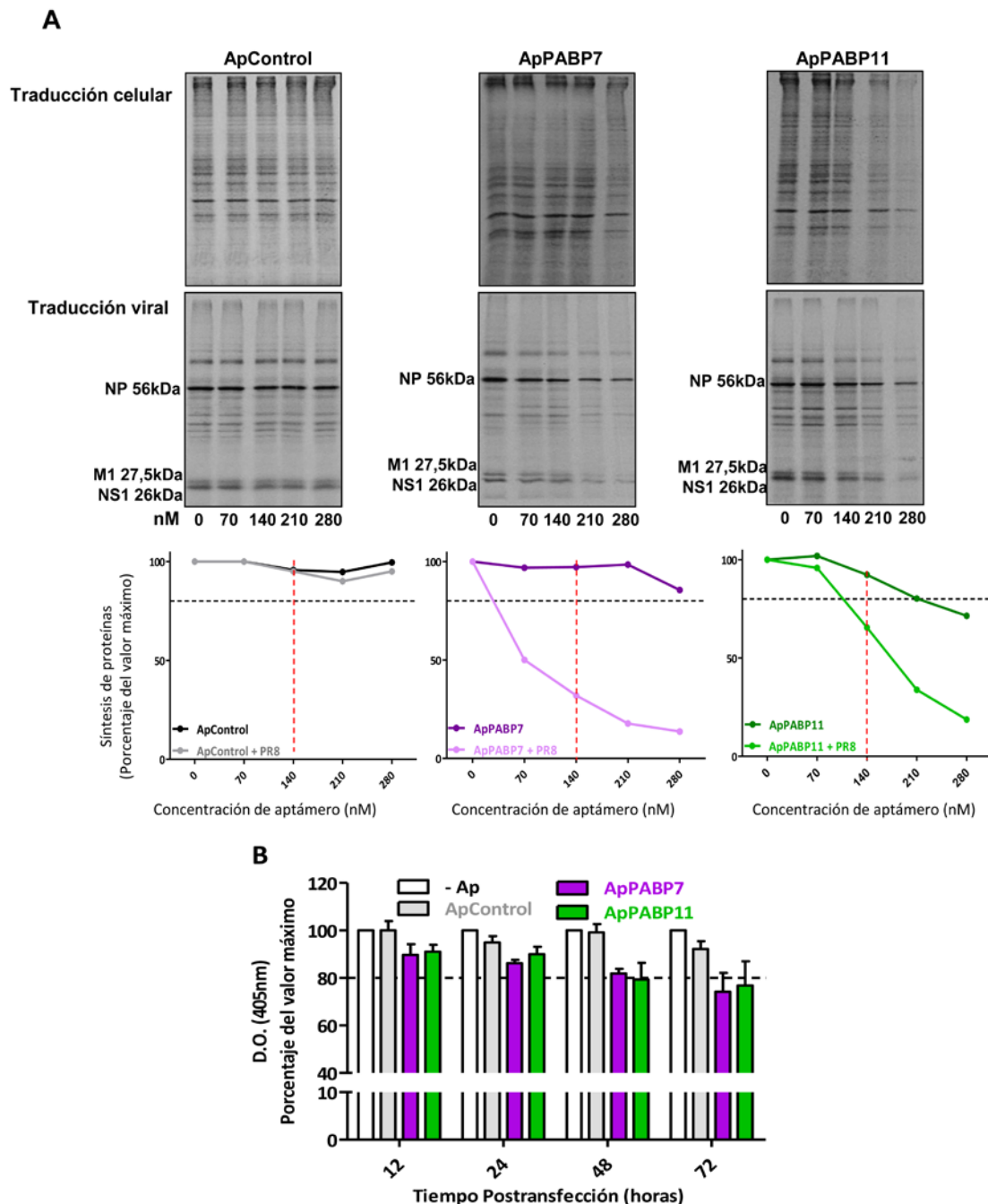


Figura R14. Determinación de la concentración de trabajo. A) Comparación del efecto inhibitorio sobre la síntesis de proteínas celulares y virales de cada uno de los aptámeros. Monocapas de células A549 fueron transfectadas con los aptámeros correspondientes a concentraciones cada vez mayores (0-280 nM). Después de 12 horas de transfección se pseudo-infectaron o infectaron con la cepa PR8 del virus de la gripe a una MDI de 2 ufp/célula. Tras 7 horas, se realizó un marcaje con Met-Cys ^{35}S y se analizaron los extractos totales de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida y *Phosphorimager*, donde la movilidad de algunas proteínas virales se indica en la parte izquierda (NP y M1/NS1). La incorporación de Met-Cys en la síntesis de NP (en las células infectadas) o del conjunto de las proteínas (células no infectadas) fue cuantificada en cada uno de los casos empleando el programa Image J. El experimento se realizó tres veces y se muestra una imagen representativa. **B)** Monocapas de células A549 fueron transfectadas con 140 nM (concentración seleccionada) de cada uno de los aptámeros correspondientes, a las horas post-transfección indicadas se determinó la toxicidad de los mismos mediante un ensayo de viabilidad celular MTT. Las barras representan la media \pm S.E.M. de dos experimentos diferentes realizados por triplicado.

Estos resultados indican que el aptámero ApPABP7 podría ser de mayor potencial antiviral tanto en cepas H1N1 como H3N2, dado que es el que mayor subida de concentración permite, hasta llegar a inhibir la traducción celular en un 50%.

2.4. Determinación de las dosis de trabajo

Como se ha mencionado anteriormente, se quiso ser lo más conservador posible en cuanto a la integridad celular se refiere, por ello se decidió proseguir los experimentos utilizando una concentración final de aptámero de 140 nM ya que en esta concentración los aptámeros no afectan, o lo hacen muy levemente, a la traducción celular, mientras que causan inhibición de la traducción viral (**Fig. R14A**). Con el objetivo de determinar la toxicidad de la concentración de aptámero seleccionada a lo largo del tiempo, las células A549 se transfectaron con 140 nM de cada uno de los aptámeros y, la toxicidad se determinó mediante la evaluación de la actividad metabólica de la biomasa celular mediante el ensayo MTT a diferentes horas postransfección. Los resultados indicaron (**Fig. R14B**) que hasta 48 después de la transfección

de los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11, no se produce daño celular y, a partir de este momento, el daño celular es moderado, lo que permite el examen de su efecto sobre la infección por virus de la gripe en estas condiciones.

2.5. Efecto de los aptámeros en infecciones de ciclo único

Los aptámeros que reconocen la proteína hPABP1 inhiben eficazmente la traducción de los mRNA virales, por ello examinamos el efecto de los mismos sobre el ciclo replicativo del virus de la gripe. Para alcanzar este objetivo, se realizaron infecciones de ciclo único y se analizaron diferentes procesos del ciclo viral.

2.5.1. Ensayo de tiempo de adición

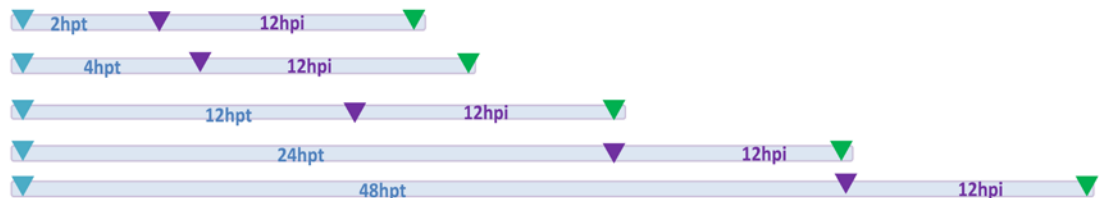
Para comenzar, se realizó un ensayo de tiempo de adición para determinar si los aptámeros tenían algún efecto en la replicación del virus de la gripe y el momento en que presentaran mayor eficiencia, . Para la realización de este ensayo, monocapas de células A549 fueron transfectadas con los aptámeros ApControl, ApPABP7 o ApPABP11. Posteriormente, a diferentes

tiempos postransfección (2, 4, 12, 24 y 48 hpt) fueron infectadas o pseudoinfectadas durante 12 horas con la cepa PR8 del virus de la gripe (**Fig.R15A**). Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes para analizar el título viral obtenido mediante ensayo de formación de placas en células MDCK. Como puede observarse en la **figura R15B**, tanto el ApPABP7 como el ApPABP11 inhiben la replicación viral y entre 4 y 24 hpt se produce la mayor disminución, aunque se sigue observando efecto sobre la formación de partículas infectivas hasta 48 horas después de la transfección de los aptámeros. Cabe señalar que a los tiempos post-transfección indicados, habría que sumar las 12 horas de infección viral, por lo tanto podemos concluir que ambos aptámeros son capaces de disminuir el título viral hasta 60 horas después de haber sido transfectados.

2.5.2. Análisis de la expresión y distribución de proteínas virales

A continuación, se analizó el efecto de los aptámeros en la expresión y distribución de

A



B

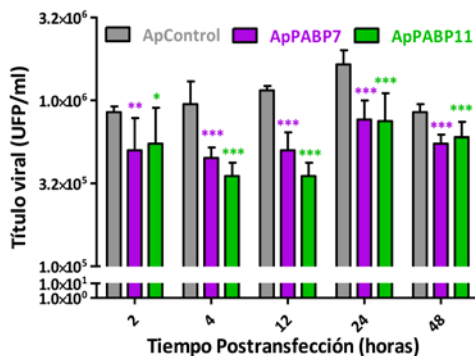


Figura R15. Ensayo de tiempo de adición. Se transfectaron células A549 con 140nM de cada aptámero (ApPABP7, ApPABP11 o ApControl). A las horas post-transfección indicadas, las células fueron pseudo-infectadas o infectadas con la cepa PR8 a una MDI de 2UFP/célula. En todos los casos el título viral fue analizado a 12 hpi. **A)** Esquema representativo de la temporalidad del ensayo. Las cajas azules representan la línea temporal. Los triángulos muestran el momento de la transfección de los aptámeros (azul), la infección con el virus de la gripe (morado) y la recogida de la muestra (verde) En azul se indican las horas post-transfección (hpt) y en morado las horas post-infección (hpi). **B)** A las horas post-transfección indicadas se analizó el título viral. Las líneas representan la media ± S.E.M. de tres experimentos diferentes y la significación estadística es relativa al ApControl. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

proteínas virales de expresión tardía (HA), así como de expresión temprana (NP). Para ello, monocapas de células A549 se transfectaron con 140 nM de los correspondientes aptámeros conjugados con el fluoróforo Alexa 488. Doce horas después de la transfección, las células fueron infectadas con la cepa VIC del virus de la gripe a 2 UFP/célula y la distribución de las proteínas virales se analizó mediante ensayos de inmunofluorescencia.

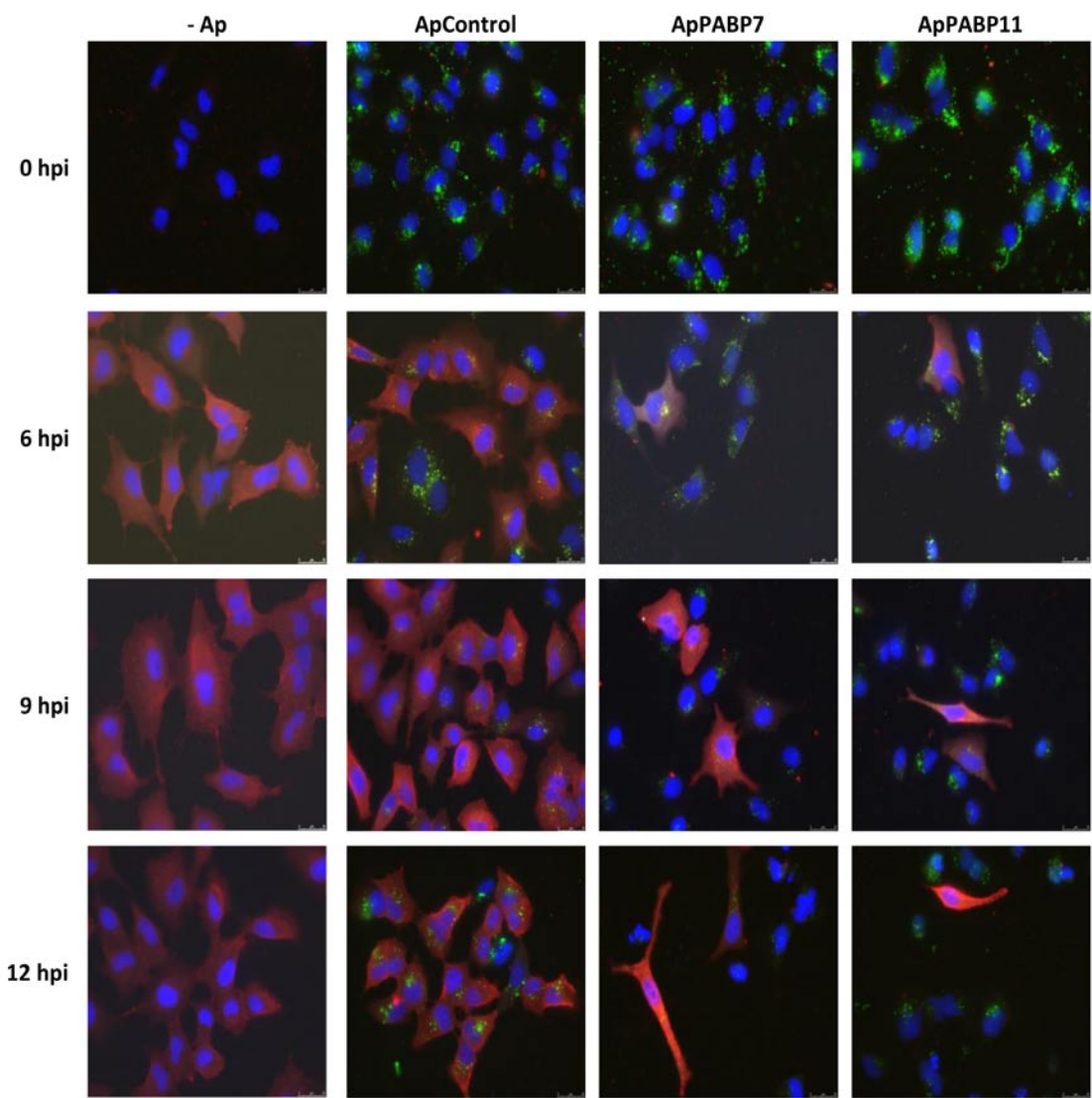


Figura R16. Efecto de los aptámeros sobre la expresión y distribución de proteínas del virus de la gripe. Monocapas de células A549 se transfectaron con 140 nM de cada uno de los aptámeros conjugados con Alexa 488. Tras 12 horas de transfección las células fueron infectadas con la cepa VIC del virus de la gripe a una MDI de 2 UFP/célula. A las horas post-infección indicadas, las células fueron fijadas y se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra la proteína HA. Las imágenes presentadas son de microscopía microfluor que muestran la presencia del núcleo (DAPI en azul), la proteína viral HA (rojo) y el aptámero transfectado (verde). El experimento se realizó dos veces y se muestra una imagen representativa

Se empleó la cepa viral VIC debido a la disponibilidad de anticuerpos anti-HA que reconocen la proteína de esta cepa. En la **figura R16**, se muestra en rojo la distribución de la proteína HA a lo largo del tiempo y, en verde los aptámeros. Como puede observarse, existe una reducción importante en el número de células infectadas con el virus de la gripe cuando éstas están transfectadas con los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11, en comparación con no transfectadas o células transfectadas con ApControl. Los mismos resultados fueron observados en la distribución de la proteína NP a lo largo del tiempo (resultados no mostrados).

2.5.3. Análisis del título viral

A continuación se analizó la capacidad de ambos aptámeros de inhibir la replicación

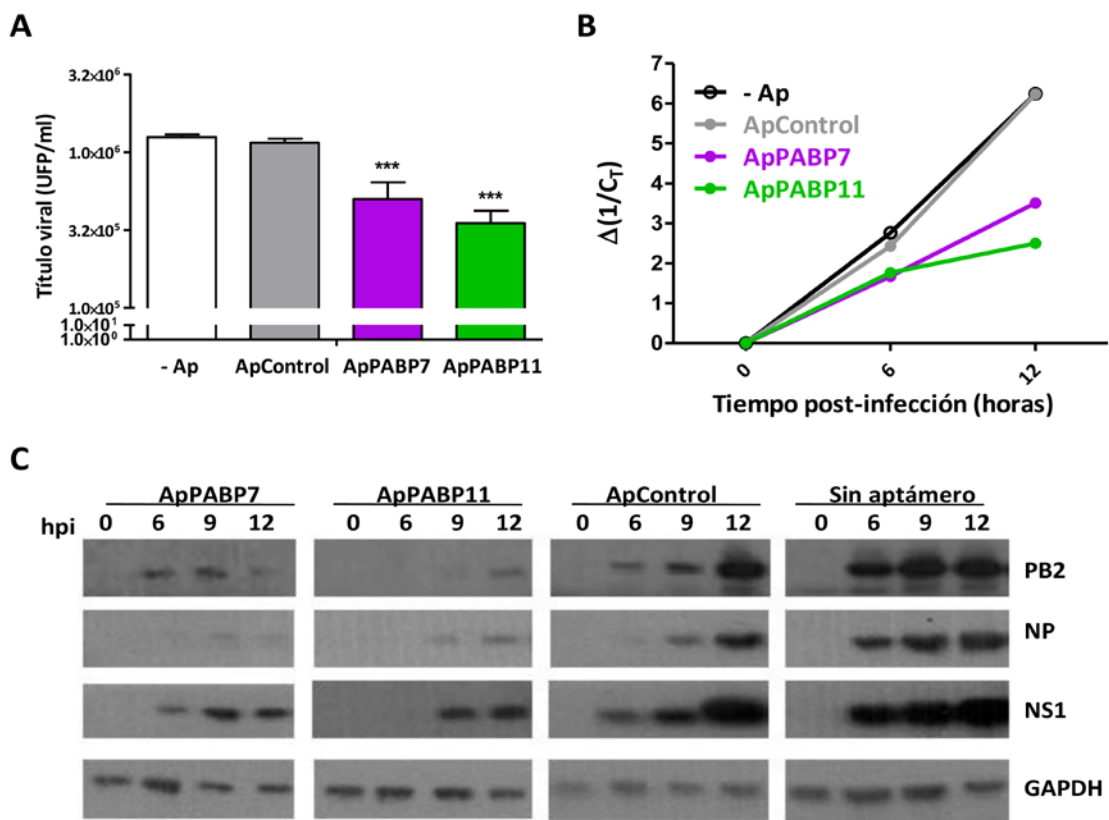


Figura R17. Cinética de infección del virus de la gripe en células A549 transfectadas con los diferentes aptámeros. Se transfectó 140 nM de cada uno de los aptámeros y a las 12 hpt las células fueron infectadas con la cepa PR8 a una MDI de 2UFP/célula. **A)** A 12 hpi el título viral se analizó por el método de ensayo de placa en células MDCK. Las barras representan la media \pm S.E.M. de tres experimentos diferentes y la significación estadística es relativa al ApControl. *** $p < 0.001$. **B)** Las células A549 fueron infectadas a 12 hpt con la cepa PR8 a 2 UFP/célula y se extrajo el RNA total a diferentes hpi. Se cuantificó el vRNA del segmento NP por RT-qPCR. El eje de ordenadas representa la inversa de incremento de Ct del vRNA de NP. El valor obtenido en las células no infectadas se toma como 0 hpi. **C)** Paralelamente, a las horas post-infección indicadas, se tomaron extractos celulares para la detección de las proteínas PB2, NP, NS1 y GAPDH (como control de carga) con anticuerpos específicos, mediante Western blot.

viral. Para ello, las células fueron transfectadas con 140 nM de cada uno de los aptámeros y, posteriormente infectadas con la cepa PR8 a una MDI de 2 ufp/célula. Se recogieron los sobrenadantes a 12 horas post-infección y se analizaron los títulos virales mediante ensayo de formación de placas en células MDCK. Los resultados de este ensayo, recogidos en la **figura R17A**, mostraron una reducción del título viral de más de 3 veces en las células transfectadas con ApPABP7 y ApPABP11, en comparación con las células no transfectadas o transfectadas con ApControl.

2.5.4. Análisis del RNA viral y la acumulación de proteínas

Paralelamente, se analizaron la cantidad de vRNA genómico viral (**Fig. R17B**) así como la acumulación de proteínas virales (**Fig. R17C**), a las hpi indicadas. Ambos ensayos mostraron una reducción en la cantidad de vRNA, así como de proteínas virales, en las células que habían sido transfectadas con los aptámeros específicos de hPABP1.

En conjunto, estos resultados indican que los aptámeros que reconocen específicamente la proteína hPABP1, producen una reducción

en la producción de partículas virales infecciosas.

2.6. Efecto de los aptámeros sobre múltiples ciclos de infección

Dado que la infección por el virus de la gripe ocurre de manera natural a baja multiplicidad de infección, se evaluó el efecto de los aptámeros en estas condiciones. Con este objetivo se transfectaron las células A549 con el aptámero control o los específicos de hPABP1. Cuatro hpt las células fueron infectadas con el virus de la gripe a 10^{-2} UFP/célula y los títulos virales se determinaron a diferentes hpi. Para estos ensayos se utilizaron dos cepas de virus de la gripe de los subtipos H1N1 y H3N2, ya que las infecciones estacionales habituales que afectan a la población se deben principalmente a los virus de estos subtipos. Como puede verse en la **figura R18A**, se registra una reducción de 1-1.5 logaritmos en los primeros tiempos de las infecciones con ambas cepas, en aquellas células que habían sido transfectadas con los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11, en comparación con las células no transfectadas, o transfectadas con el ApControl. No se

encontraron diferencias importantes en los títulos virales a 48 hpi, tanto en las células infectadas con VIC (H3N2) y como con PR8 (H1N1).

Los resultados anteriores, en cuanto al efecto de los aptámeros específicos de hPABP1 sobre la replicación del virus de la gripe a alta MDI, sugerían una mayor reducción de la replicación viral en experimentos de cinética viral de ciclo múltiple (Figs. R16 y R17). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que se requieren varios ciclos de división celular para estos experimentos cinéticos y que las nuevas células no reciben los aptámeros correspondientes ya que éstos no replican y, sólo las células iniciales habrán captado los compuestos.

Paralelamente, con el objetivo de determinar si la presencia del virus provocaba una degradación intracelular de los aptámeros, se cuantificó por qPCR la cantidad intracelular de cada uno de ellos en las células infectadas y pseudo-infectadas. Como puede apreciarse en la figura R18B, la acumulación intracelular

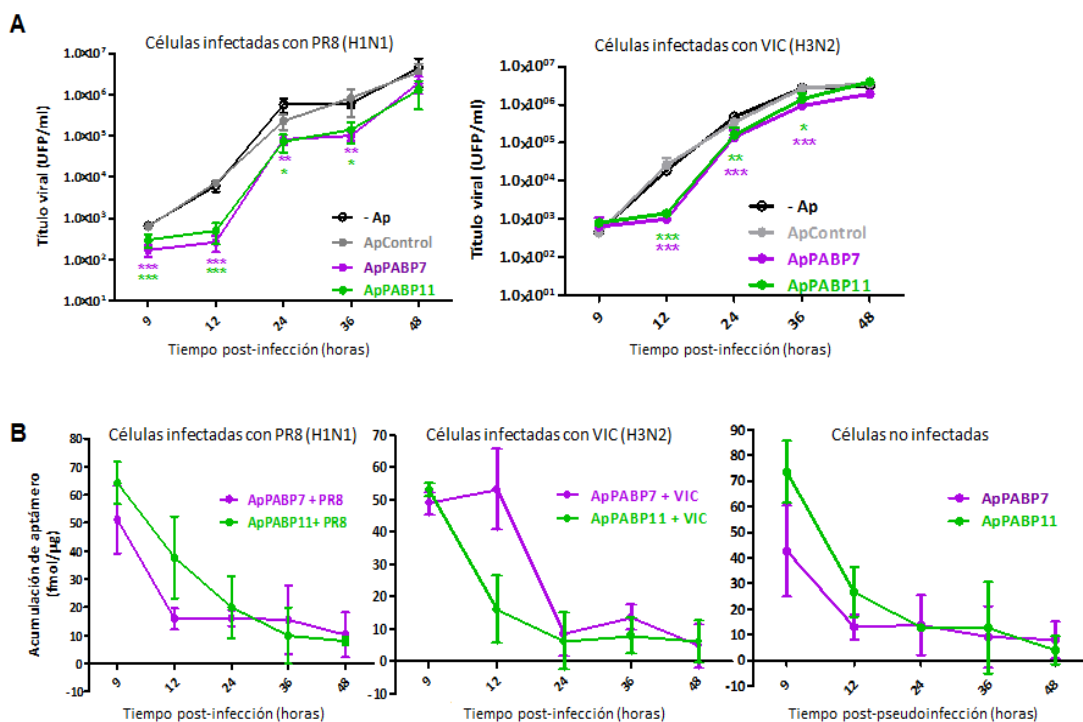


Figura R18. Cinética de infección del virus de la gripe en células 549 transfectedas con los diferentes aptámeros y mantenimiento de los aptámeros. Se transfeció 140 nM de cada uno de los aptámeros específicos de hPABP1, junto con los controles (Sin aptámero y ApControl). A las 4 horas, las células fueron pseudo-infectadas o infectadas con las cepas PR8 o VIC a un aMDI de 0.02UFP/célula. **A)** A las horas post-infección indicadas se analizó el título viral. **B)** Paralelamente, se recogieron extractos celulares y se midió la acumulación intracelular de cada aptámero mediante qPCR. Las líneas representan la media \pm S.E.M. de tres experimentos diferentes y la significación estadística es relativa a la del ApControl. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

de cada aptámeros disminuye a lo largo del tiempo, independientemente de la presencia del virus de la gripe. La reducción de entre un 50% y un 90% en la cantidad de aptámero intracelular a 24 hpi, se correlaciona con la reducción moderada del título viral en este tiempo post-infección, en comparación con los títulos obtenidos a las 12 hpi cuando la acumulación intracelular de aptámeros es alta.

Consecuentemente, la falta de replicación de aptámeros y su disminución intracelular durante varias rondas de replicación viral, podrían impedir que se dé una mayor reducción en la producción de partículas virales en presencia de los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11.

Con el fin de obtener una mayor reducción sobre la producción de partículas virales, se realizaron diversos experimentos de ciclo múltiple. Por un lado, las células A549 fueron infectadas con ambas cepas virales (H3N2 y (H1N1) a 10^{-2} de MDI y, tras la hora de adsorción se añadió el medio, para posteriormente transfectar las células añadiendo 140 nM de cada uno de los aptámeros. De este modo, las

células no fueron lavadas tras la transfección de los aptámeros y permanecieron en el cultivo celular durante todo el experimento. Se realizó un ensayo adicional transfectando 70 nM de cada uno de los aptámeros 4 horas antes de la infección de las células A549 y, volviendo a transfectar 70 nM de cada aptámero tras la hora de adsorción viral, con el objetivo de tener el aptámero presente en las células antes de la llegada del virus y, mantener una pequeña proporción tras la infección con el mismo. En ambos casos, los resultados fueron similares a los obtenidos en la **figura R18A** (resultados no mostrados).

2.7. Estudio del mecanismo de acción de los aptámeros

Durante la infección por el virus de la gripe, la síntesis de proteínas de la célula huésped es bloqueada eficientemente (Garfinkel & Katze 1993). Tras la infección, la maquinaria de traducción celular es reclutada hacia los mRNAs virales, permitiéndose su traducción selectiva (Garfinkel & Katze 1993, Park & Katze 1995). Una red de interacciones virus-huésped parece contribuir a este mecanismo, como la asociación del complejo de la polimerasa viral

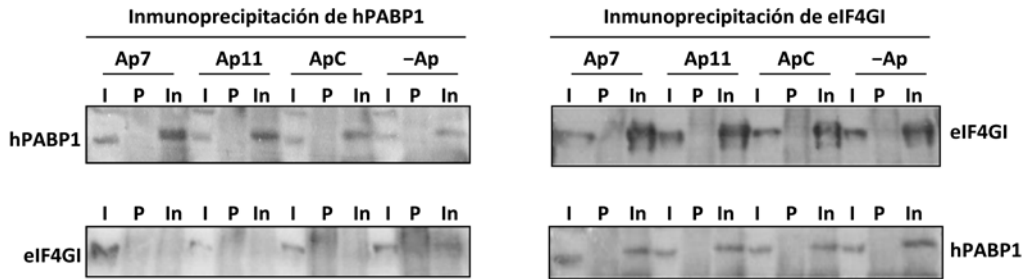
con complejos de iniciación de la traducción, mediante la subunidad PB2 de la polimerasa viral con la proteína eIF4GI (Burgui, Yanguéz et al. 2007, Yanguéz, Rodríguez et al. 2012). Otras interacciones implican a la proteína viral NS1, que se asocia con factores de iniciación de la traducción como hPABP1 (Burgui, Aragon et al. 2003) y la proteína eIF4GI (Aragon, de la Luna et al. 2000). En conjunto, estas interacciones permiten la traducción selectiva de los mRNAs virales en las células infectadas y muestran una dependencia importante de los complejos celulares de iniciación de la traducción para la traducción eficiente de los mRNAs virales.

Dado que los aptámeros dirigidos contra la proteína hPABP1 inhiben eficazmente la traducción de mRNAs virales así como la replicación viral, estudiamos la posibilidad de que los aptámeros pudieran perturbar la asociación de complejos de iniciación de la traducción viral. Con este objetivo, células A549 fueron transfectadas con los aptámeros ApControl, ApPABP7 y ApPABP11, tras 12 horas se infectaron a alta MDI con la cepa PR8 y tras 8 h de infección se realizaron diferentes

estudios de co-inmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra hPABP1 y eIF4GI. La presencia de aptámeros que reconocen la hPABP1, no produjo ninguna reducción en la inmunoprecipitación de hPABP1 (**Fig. R19A, izquierda**). Sin embargo, el factor eIF4GI estaba casi ausente en los inmunocomplejos obtenidos con éste anticuerpo (**Fig. R19A, izquierda**). Por otro lado, en los ensayos de co-inmunoprecipitación con el anticuerpo anti eIF4GI, se observa la presencia tanto de hPABP1 como de eIF4GI en los inmunocomplejos, independientemente de que las células hayan sido transfectadas o no con los diferentes aptámeros (**Fig. R19A, derecha**). Estos resultados indican que los aptámeros no bloquean la interacción de eIF4GI con PABP1 y sugiere que existe una población de hPABP1 que no está asociada con eIF4GI, ya que esta proteína apenas co-inmunoprecipita con anticuerpos contra hPABP1.

A continuación, se examinó el efecto de los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11 en la asociación de la subunidad PB2 de la polimerasa viral y la proteína NS1 del virus, con

A



B

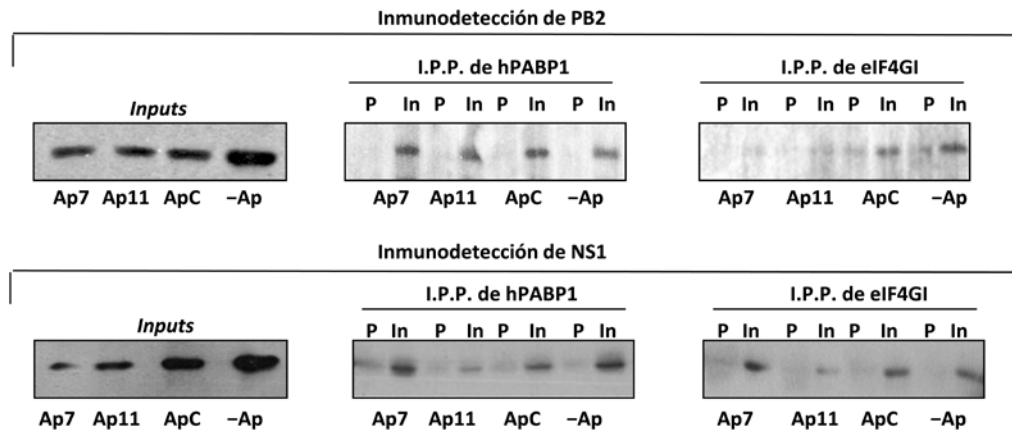


Figura R19. Efecto de los aptámeros en la asociación de la proteína viral con complejos de iniciación de la traducción. Se transfectoron células A549 con los aptámeros correspondientes (140 nM). A 12 hpt se infectaron con la cepa PR8 del virus de la gripe a una MDI de 2 UFP/célula. Los extractos celulares se obtuvieron a 9 hpi y se inmunoprecipitó hPABP1 o eIF4GI. Los complejos recuperados se analizaron por Western blots. **A)** Inmunoprecipitación de hPABP1 (izquierda) y de eIF4GI (derecha), revelándose con anticuerpos específicos de hPABP1 y eIF4G en cada caso. **B)** Inmunoprecipitación de hPABP1 y eIF4GI, revelándose con anticuerpos específicos de PB2 (arriba) y NS1 (abajo). (I.P.P.: Inmunoprecipitación; I: extracto celular inicial; P: suero preinmune; In: suero inmune; Ap7: ApPABP7; Ap11: ApPABP11; ApC: ApControl; -Ap: Sin aptámero). El experimento se realizó tres veces y se muestra una imagen representativa.

los complejos de iniciación de la traducción. Como puede observarse (**Fig. R19B, arriba**), ninguno de los aptámeros redujo la asociación de PB2 con la proteína hPABP1, mientras que los dos aptámeros específicos de hPABP1 redujeron la asociación de PB2 con eIF4GI. En cuanto a las interacciones de NS1 (**Fig. R19B, abajo**), la presencia de ApPABP11, redujo la asociación de NS1 con ambas proteínas, hPABP1 y eIF4GI, mientras que la presencia de ApPABP7 no modificó sus interacciones. En resumen, el aptámero ApPABP11 perturba la asociación de ambas proteínas virales, PB2 y NS1, con complejos de iniciación de la traducción, mientras que el aptámero ApPABP7 reduce la asociación de la subunidad PB2 de la polimerasa con estos complejos.

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA REGIÓN ESPECÍFICA DE SEGMENTO DEL GENOMA DEL VIRUS DE LA GRIPE

La secuencia nucleotídica de los extremos no traducidos del genoma de los virus son de un interés considerable por su implicación en procesos específicos virales, tales como la transcripción, la traducción o la replicación. Sin embargo, pese a la gran importancia de esta región, la mayor parte de la información que se conoce en el virus de la gripe corresponde a la región promotora de ésta, y poco se conoce acerca de la función de las secuencias específicas de segmento, localizadas entre el promotor viral y el codón de inicio de la traducción. Clásicamente se ha atribuido a la región promotora las funciones de regulación de los procesos de transcripción y replicación virales, teniendo gran importancia la conformación estructural que adquiere. En el modelo aceptado actualmente, la polimerasa reconoce los vRNAs virales mediante su unión a la región conservada del extremo 5' del RNA (Fodor, Pritlove et al. 1994, Tiley, Hagen et al. 1994, Fodor, Pritlove et al. 1995), para posteriormente unirse a ambos extremos en

una conformación de *corkscrew* o a través de una conformación híbrida *fork-corkscrew*. Sin embargo, también se ha descrito que los nucleótidos de la región específica de segmento son importantes y son capaces de modular la actividad del promotor viral (Bergmann & Muster 1996, Zheng, Palese et al. 1996). Como se ha mencionado con anterioridad, la región específica de segmento, también participa en la estimulación traduccional selectiva de los mRNAs virales, modulada por la proteína NS1 (Enami, Sato et al. 1994), así como en el empaquetamiento de las vRNPs (Luytjes, Krystal et al. 1989, Fujii, Fujii et al. 2005) y en el *splicing* del segmento 7 (Zheng, Wang et al. 2015).

Teniendo en cuenta que la estructura que adopta el RNA es importante para la correcta función promotora, y la importancia que parecen tener las regiones específicas de segmento, se decidió realizar un estudio detallado de los nucleótidos 15, 16, 17 y 18 del extremo 3'UTR del vRNA del segmento 8 del virus de la gripe (**Fig. R20**). Se eligieron estos nucleótidos debido a que el nucleótido 15 del extremo 3'UTR aunque no forma parte

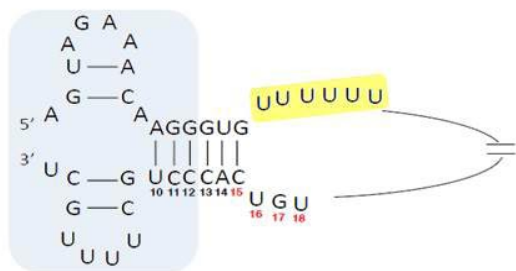


Figura R20. Estructura de la conformación de corkscrew de la región no codificante del vRNA del segmento NS del virus de la gripe. El recuadro azul señala la región promotora. En amarillo se muestra la señal de poliadenilación. En rojo se numeran las posiciones de los nucleótidos objeto de estudio.

del promotor, aparea con el nucleótido 14 del extremo 5'UTR, mientras que los nucleótidos 16, 17 y 18 no aparean con el extremo 5'UTR, al menos en las conformaciones de *panhandle* y *crokscrew*, que han sido las aceptadas clásicamente. De este modo, cualquier modificación que se introduzca en el nucleótido 15, podría afectar a la estructura del promotor viral, frente aquellas modificaciones que se introduzcan en el resto de los nucleótidos. Por otra parte, la elección del extremo 3'UTR como objeto de estudio, se debe a que modificaciones fuera de la región promotora implicarían una alteración en la señal de poliadenilación.

Para realizar el estudio de la región específica de segmento, se decidió estudiar el segmento 8 del virus de la gripe dado que

codifica la proteína NS1, bien caracterizada en la actualidad.

1. CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE LA REGIÓN ESPECÍFICA DE SEGMENTO

1.1. Estudio de homología de secuencias

Las regiones específicas de segmento del genoma viral se encuentran altamente conservadas entre diferentes cepas del virus de la gripe (Desselberger, Racaniello et al. 1980, Stoeckle, Shaw et al. 1987) y, aunque no son considerados parte del promotor viral, forman parte de la estructura secundaria de *corkscrew* o *fork-corkscrew* cuando la polimerasa viral se une a ellos (Flick, Neumann et al. 1996). Estudios realizados en el virus que causó la pandemia de 1918 (H3N2) muestran como las UTRs del segmento NS presentan muy poca variación a lo largo del tiempo y una velocidad de cambio extremadamente baja (Furuse & Oshitani 2011). Con el objetivo de determinar la evolución de los nucleótidos objeto de estudio, se realizó un análisis de comparación de secuencias entre todos los virus de los subtipos humanos H1N1 y H3N2, que son los que infectan a humanos de manera periódica. Así mismo, se incluyó en dicho

estudio aquéllos virus de origen porcino, dado que constituye un ambiente propicio para la recombinación de segmentos.

Para realizar dicho análisis se tomaron las secuencias del segmento 8 (NS) de los subtipos H1N1 y H3N2 humanos, así como los de origen porcino presentes en la base de datos “Influenza Virus Resource” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>) desde que se tiene registro, hasta febrero de 2014. Posteriormente, se realizó un alineamiento de cada uno de los subtipos entre sí utilizando el programa Clustal Omega (Sievers, Wilm et al. 2011). Teniendo en cuenta, que el objeto de estudio son los nucleótidos de las posiciones 15, 16, 17 y 18 del extremo 3’, se empleó el programa JalView (Waterhouse, Procter et al. 2009) para analizar y visualizar cada uno de los alineamientos múltiples de esta región. Finalmente, el análisis estadístico

del nucleótido presente en cada una de las posiciones fue calculado con el programa MATLAB (MATLAB, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States). Como puede observarse en la **Tabla R1**, el grado de homología que presentan todos los virus de un mismo subtipo, y entre los diferentes subtipos, está muy próximo al 100%, presentándose la mayor variación en el nucleótido 16 del extremo 3’ de los subtipos H1N1, con una probabilidad de cambio de un 0.191. Estos datos sugieren que existe una fuerte presión selectiva sobre estos nucleótidos, aunque es permitido algún cambio en la secuencia nucleotídica.

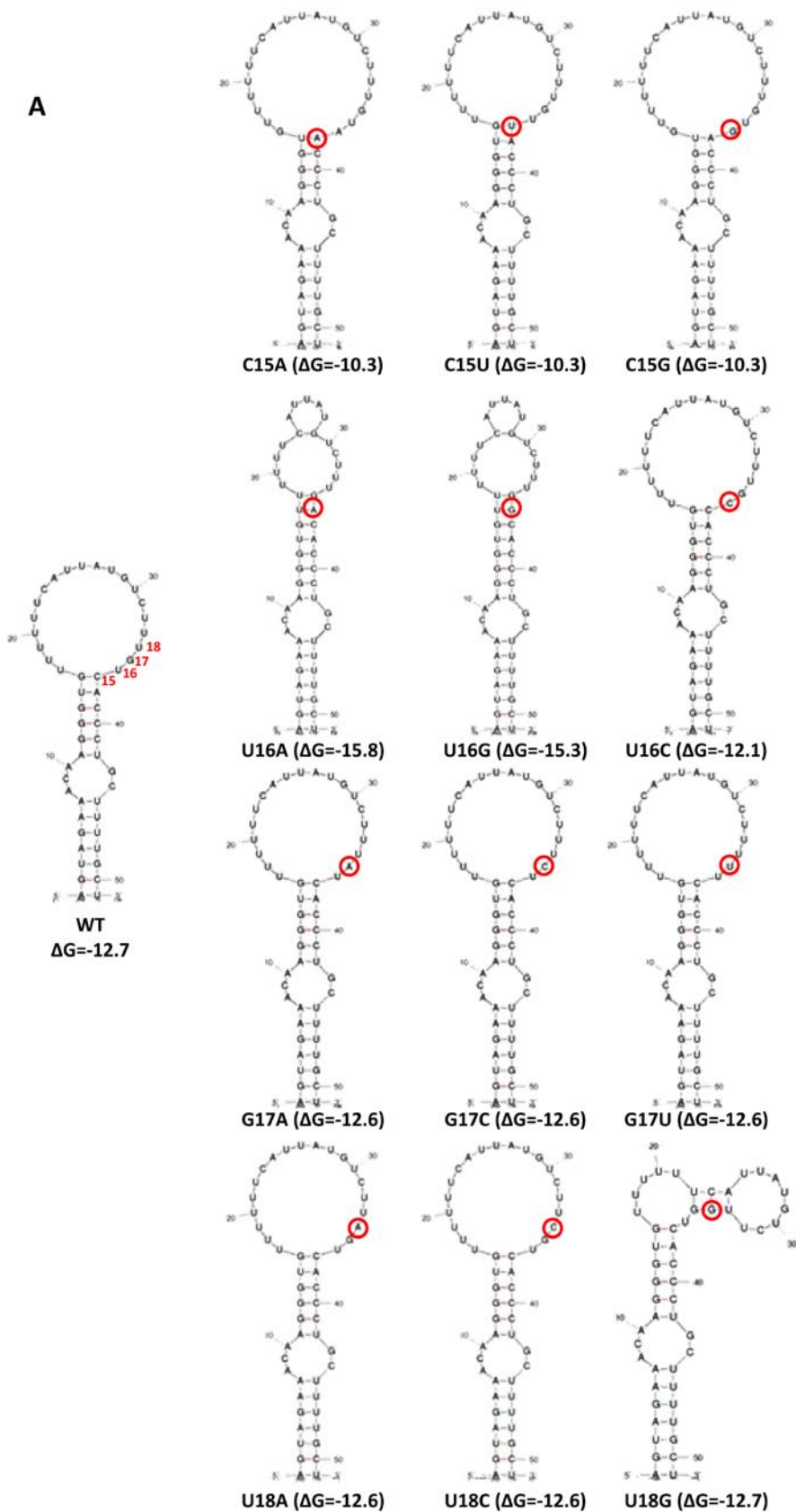
1.2. Estructuras de la región no codificante del segmento NS

Como se ha mencionado, no solo la estructura de la región conservada es importante para el proceso de replicación

Tabla R1. Análisis de homología de secuencia de la región 3’UTR del vRNA (5’UTR del mRNA)

Nucleótido original	C			U			G			U		
	Posición 15			Posición 16			Posición 17			Posición 18		
Cepas	H1N1	H3N2	Porcinas	H1N1	H3N2	Porcinas	H1N1	H3N2	Porcinas	H1N1	H3N2	Porcinas
Probabilidad de aparición de U	0	0	0	0.808	0.999	0.955	0.013	0	0.02	1	0.997	1
Probabilidad de aparición de G	0.013	0	0.001	0	0	0	0.984	1	0.978	0	0	0
Probabilidad de aparición de C	0.984	1	0.998	0.191	0.005	0.444	0	0	0	0	0	0
Probabilidad de aparición de A	0.001	0	0	0	0	0	0.002	0	0.018	0	0.002	0

A



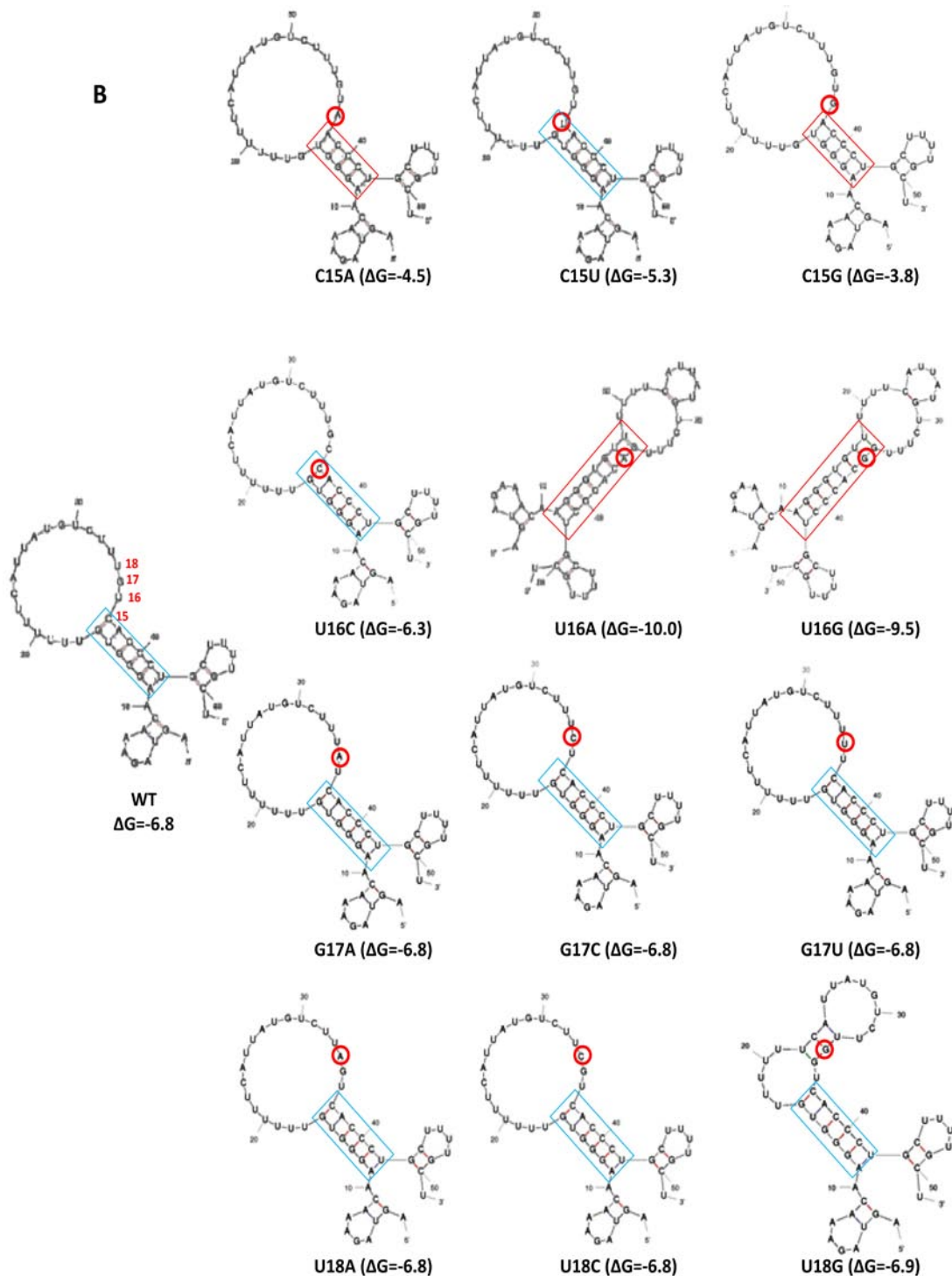


Figura R21. Predicción de la estructura del segmento NS modificando las posiciones 15, 16 y 17 del extremo 3'UTR del vRNA. Los números rojos sobre las estructuras del WT representan los nucleótidos objeto de estudio. Un círculo rojo señala la posición de la modificación introducida en la conformación de *panhandle* (A) y de *crokscREW* (B). El elemento distal se señala con un rectángulo azul o rojo (si la estructura se ve modificada respecto al WT). Debajo de cada estructura se presenta: nucleótido original, posición modificada y cambio introducido, junto con el valor ΔG (mayor ΔG , menor estabilidad). El análisis se realizó con el programa mFold.

viral, sino que también los nucleótidos de la región no conservada son importantes (Bergmann & Muster 1996) para la modulación de la actividad promotora del virus (Zheng, Palese et al. 1996). Teniendo en cuenta que el nucleótido de la posición 15 del extremo 3' además de aparear con el nucleótido 16 del extremo 5' es el más cercano al promotor viral, se decidió estudiar *in silico* como afectarían los cambios de nucleótido en cada una de estas posiciones. Como puede observarse, tanto en el modelo de *Panhandle* (Fig. R21A), como en el de *corkscrew* (Fig. R21B), las modificaciones sobre el nucleótido de la posición 15 del extremo 3', son las que más incremento de energía libre (ΔG) implican y por tanto, las que conllevan una mayor inestabilidad estructural. Además, los cambios a NS15A y NS15G implican una pérdida del apareamiento entre bases, provocando la apertura del bucle distal. Las

modificaciones del nucleótido 16, en el que ya no hay apareamiento con la región 3', implican cambios estructurales (NS16A y NS16G) que conllevan un incremento en la estabilidad estructural del RNA. Para la posición 17 no se predice ninguna modificación estructural y, para la posición 18, solo el cambio NS18G podría generarse un *hairpin* extra.

El hecho de no realizar el estudio en la estructura *fork-crokscrew* se debe a que, por el momento, no hay información acerca de la longitud de la zona de apareamiento entre los nucleótidos de ambos extremos.

1.3. Generación de mutantes puntuales en el segmento NS

Con el objetivo de evaluar cuál es el papel de estos nucleótidos próximos a la región promotora, se elaboró una batería de mutantes sobre un plásmido que porta el gen de la Acetil Cloranfenicol Transferasa (CAT) en sentido antimensajero, flanqueado por las

Tabla R2. Nomenclatura de los plásmidos empleados para los estudios in vitro y de los virus recombinantes para los estudios in vivo		
Posición del extremo 3' del vRNA del segmento NS	Cambio introducido	Nomenclatura
C 15	A, G, U	NS15A, NS15G, NS15U
U 16	A, C, G	NS16A, NS16C, NS16G
G 17	A, C, U	NS17A, NS17C, NS17U
U 18	A, C, G	NS18A, NS18C, NS18G

regiones no codificantes del segmento 8 del virus de la gripe y dirigido bajo el promotor de la polimerasa I. Para ello, se introdujeron mutaciones puntuales en las posiciones 15 a 18 del extremo 3' correspondiente al vRNA del segmento NS. De este modo, se generaron un total de 12 plásmidos, portando cada uno de ellos la mutación correspondiente (**Tabla R2**).

1.4. Efecto de las modificaciones introducidas en la región específica de segmento sobre la actividad transcritiva-replicativa de la polimerasa viral

En primer lugar, se decidió evaluar cuál es el papel que juegan estos cuatro nucleótidos, pertenecientes a la región específica de segmento, sobre los procesos de transcripción y replicación virales. Para ello, se utilizó el sistema de reconstitución de RNPs, ya que este ensayo nos permite trabajar en un sistema experimental más sencillo que la infección pero que mimetiza los procesos que tienen lugar en el núcleo de una célula infectada. Este sistema consiste en la co-transfección de los plásmidos que expresan la polimerasa viral y NP junto con el plásmido que da lugar al vRNA molde (**Fig. R22A**). De esta forma se establece

un sistema de transcripción-replicación viral transitorio que permite estudiar la actividad de la polimerasa es decir, los procesos de transcripción, replicación y expresión génica virales sin tener en cuenta otros procesos que tienen lugar durante la infección (Mena, Vivo et al. 1996), (Ortega, Martin-Benito et al. 2000).

Utilizando los diferentes replicones del segmento NS, evaluamos la implicación de cada una de las mutaciones en dichos procesos mediante dos aproximaciones midiendo, no sólo la cantidad total de proteína CAT acumulada, sino los diferentes tipos de RNA "*flu-like*" de CAT sintetizados. Para la realización de estos ensayos se llevaron dos tipos de controles negativos. Por una parte, se preparó una muestra en la que se omitió agregar en la mezcla de transfección el plásmido de expresión de la proteína viral PA. Adicionalmente, se reconstituyeron RNPs cuyo molde portaba una mutación en la región promotora.

1.4.1. Acumulación total de proteína CAT

Se reconstituyeron RNPs virales en células HEK293T mediante la co-transfección de

estas células con los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa, NP y cada uno de los moldes generados en el plásmido pHH-NS-CAT. Tras 16 horas, se recogieron los extractos celulares y se determinó la acumulación de proteína CAT mediante un ensayo ELISA.

Como se observa en la **figura R22B**, tanto la omisión del plásmido que expresa la subunidad PA de la polimerasa viral, como la transfección de moldes con delecciones en el promotor, no producen acumulación de proteína CAT. Por el contrario, ninguna de las mutaciones puntuales introducidas en la región específica de segmento altera de manera significativa la expresión de proteína CAT. Estos resultados sugieren que ninguna de las modificaciones afecta a los procesos de transcripción y/o replicación viral.

1.4.2. Ensayo de Primer Extension

Con el objetivo de confirmar los resultados anteriores y, determinar si las mutaciones afectan a los procesos individuales de transcripción o replicación viral, se cuantificaron los niveles de acumulación de los vRNAs, cRNAs y mRNAs del segmento NS

en células en las que se reconstituyeron RNPs virales. Nuevamente, se co-transfectaron cultivos de células HEK293T con los plásmidos que codifican las subunidades de la polimerasa, NP y los moldes generados en el plásmido pHH-NS-CAT. Paralelamente, se llevaron los controles negativos indicados anteriormente.

Tras 16 horas se aisló el RNA total de las células y se determinaron las cantidades de RNAs específicos del segmento NS mediante ensayo de *Primer Extension*. Como se observa en la **figura R22C**, ninguno de los controles negativos es capaz de producir ninguna de las especies de RNA viral además, se observa que ninguna de las mutaciones altera la proporción entre las diferentes especies de RNA viral (**Fig. R22D**). Este resultado confirma que las mutaciones de las posiciones 15, 16, 17 y 18, no conllevan un efecto sobre los procesos de transcripción ni replicación virales del segmento NS del virus de la gripe, en condiciones de polimerasa viral fuera del contexto viral.

Estos resultados en su conjunto, sugieren que estos moldes son bien reconocidos por la RNA polimerasa RNA dependiente del virus

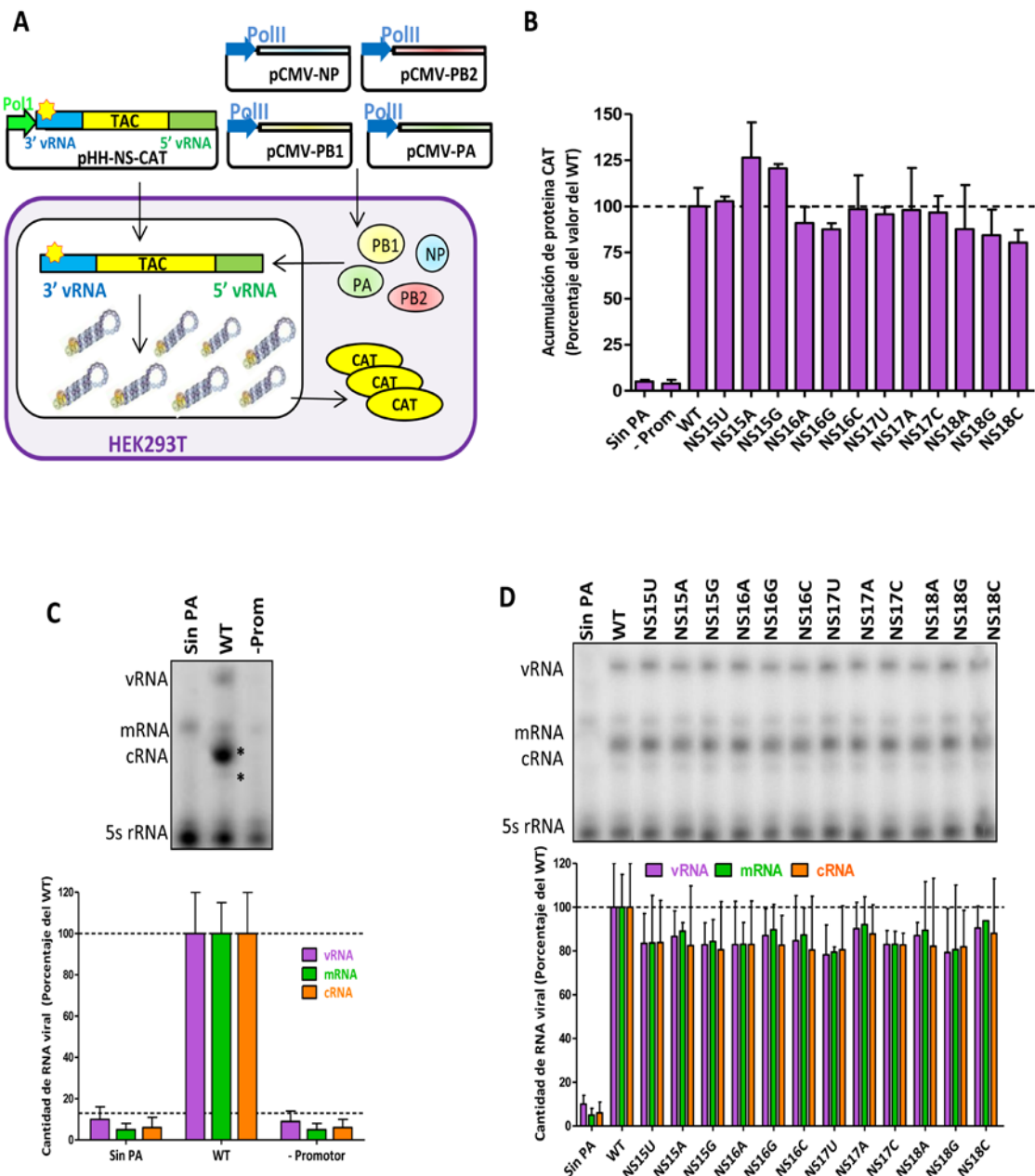


Figura R22. Efecto de las modificaciones en la actividad transcritiva-replicativa de la polimerasa viral. **A)** Esquema del sistema de reconstitución de RNPs virales recombinantes. Se co-transfectó la línea celular HEK293T con cuatro plásmidos que contienen el cDNA de las subunidades PB1, PB2, PA y NP bajo el promotor de CMV, junto con un plásmido que expresa un pseudo-replicón en polaridad negativa (pHH-NS-CAT salvaje o modificado), 16hpt se recogieron los extractos celulares para analizar la acumulación de proteína CAT o la relación de los diferentes RNAs virales. **B)** La acumulación de la proteína CAT se indica como porcentaje del valor máximo. Las barras representan la media \pm S.E.M. de seis experimentos diferentes. **C)** y **D)** La acumulación de los RNAs virales se determinó por ensayo de Primer Extension, mediante la hibridación con sondas específicas de cada especie de RNA y se presentan como porcentaje del valor máximo. Las barras representan la media \pm S.E.M. de cuatro experimentos diferentes.

de la gripe.

1.5. Efecto de las mutaciones en un contexto próximo a la infección

La infección por el virus de la gripe implica una compleja red de interacciones entre proteínas del virus y de la célula hospedadora, esenciales para que se produzca una infección eficiente. Durante la infección, no solo la polimerasa viral juega un papel importante en el establecimiento de interacciones virus-huésped, también son importantes otras proteínas implicadas en la transcripción viral, en el transporte de los RNA virales o factores relacionados con la traducción de RNAs virales (Engelhardt, Smith et al. 2005, Burgui, Yanguéz et al. 2007, Mayer, Molawi et al. 2007, Honda 2008, Jorba, Juárez et al. 2008, Bortz, Westera et al. 2011, Landeras-Bueno, Jorba et al. 2011, Rodríguez, Pérez-González et al. 2011). Además, el virus de la gripe codifica proteínas que están presentes sólo durante la infección y que ejercen funciones fundamentales durante el ciclo viral.

Para examinar la contribución no solo de la polimerasa viral, sino también de otras proteínas virales, además de los efectos de las

interacciones virus-huésped en la expresión del segmento NS, se realizaron ensayos de transfección-infección en los que se transfectaron células HEK293T con cada uno de los plásmidos que dará lugar al vRNA molde en sentido antimensajero. 16 horas después, se infectaron las células transfectadas con la cepa PR8 a alta multiplicidad de infección. De este modo el complejo de la RNP viral, reconocerá el vRNA exógeno como si fuera propio y seguirá todos los procesos virales de transcripción, replicación, transporte y traducción de proteínas. Tras 9 horas de infección se recogieron los extractos celulares que posteriormente se utilizaron para cuantificar la acumulación de la proteína CAT, mediante un ensayo ELISA (**Fig. R23A**). La cantidad de proteína CAT acumulada en cada uno de los casos, reflejará cómo se ven afectados el conjunto de los procesos virales por la presencia de cada una de las mutaciones.

Como puede observarse en la **figura R23B**, se obtuvo una disminución de la acumulación de proteína CAT en aquellas células que fueron transfectadas con los plásmidos que portaban

mutaciones en la posición 15, comparados con las que portan el plásmido silvestre. Además, se observa cierta disminución en la expresión de dicha proteína en las transfecciones con moldes que portan otras mutaciones tales como la NS16C, NS18G y NS18C. Adicionalmente, se obtuvo que pese a la gran bajada en acumulación de proteína CAT, la acumulación de proteínas virales no se vio afectada por la alteración de la posición 15 del extremo 3' del vRNA (**Fig. R23C**).

Estos resultados confirman que algunas de las mutaciones introducidas, fundamentalmente las de la posición 15,

tienen un claro efecto en la expresión génica viral.

2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS MUTACIONES EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRIPE

Pese a que los ensayos de transfección-infección, suponen un contexto próximo a la infección y permiten analizar la contribución de diferentes proteínas virales, además de los efectos de las interacciones virus-huésped en la expresión del segmento NS, hay que tener en cuenta que este sistema implica una competición entre el vRNA

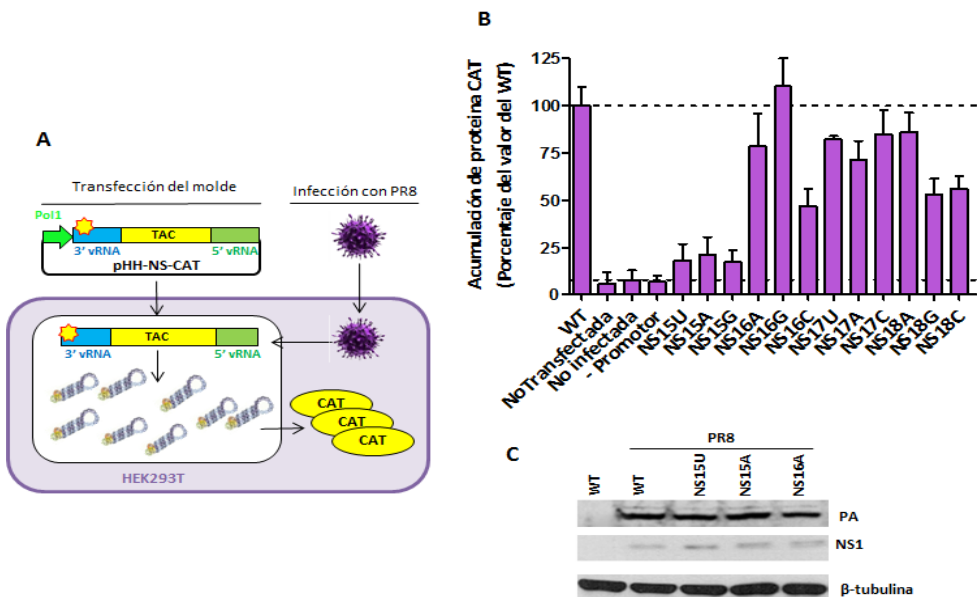


Figura R23. Sistema de transfección-infección. A) Esquema del diseño experimental. Se transfectó la línea celular HEK293T con el plásmido pHH-NS-CAT que expresa un pseudo-replicón en polaridad negativa (pHH-NS-CAT silvestre o modificado). A 16 hpt se infectó con la cepa PR8 del virus de la gripe. A las 9 hpi, se prepararon extractos totales de las células que fueron emplearon para medir la acumulación de la proteína CAT (**B**) mediante un ensayo ELISA (se indica como porcentaje del valor máximo), así como para comparar la acumulación de proteínas PA y NS1 mediante Western blot con anticuerpos específicos (**C**). Se usó la β-actina como control de carga. Se presenta la media ± S.E.M. de cinco experimentos independientes.

propio del virus y los vRNAs exógenos que se transfectan. Además, el segmento NS-CAT no produce la proteína NS1, lo que podría estar enmascarando otros resultados. De este modo y, en vista de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se decidió avanzar más en el análisis de la relevancia que esta región tiene en la infección por el virus de la gripe.

Para ello, se procedió a analizar distintas características del crecimiento del virus de la gripe que portaran las mutaciones seleccionadas.

2.1. Recate de virus en el entorno de PR8

Se rescataron virus PR8 recombinantes (Fig. R24), portando cada uno de ellos en

el segmento NS una de las mutaciones seleccionadas. El origen de la composición génica de los virus rescatados sigue la misma nomenclatura que la mostrada en la **tabla R2**. Para confirmar el mantenimiento de las mutaciones, todos los virus rescatados fueron secuenciados antes y después de su amplificación, así como después de hacer los diferentes ensayos a alta y baja MDI que se detallan a continuación, sin detectarse en ningún caso reversión de las mutaciones.

2.2. Cinéticas de crecimiento a alta multiplicidad de infección

2.2.1. Análisis de la acumulación de proteínas virales

En primer lugar, se analizó la capacidad de

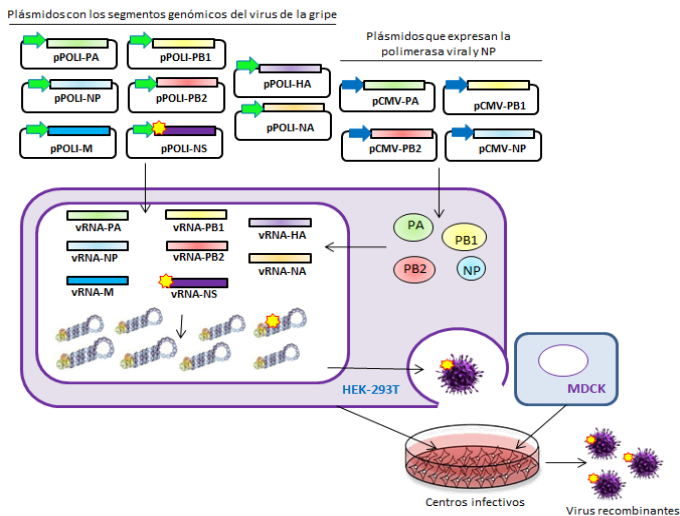


Figura 24. Rescate de virus recombinantes. La co-transfección de los ocho plásmidos que codifican los segmentos virales junto con los plásmidos de expresión de la polimerasa viral y NP da lugar a la formación de las ocho RNPs virales, que al replicar y transcribir dan lugar a todos los productos virales necesarios para la obtención de una progenie viral. Los virus producidos son posteriormente amplificados en células productivas (MDCK) mediante centros infectivos. Adaptado de (Neumann, Watanabe et al. 1999)

acumulación de proteínas virales de cada uno de los virus rescatados. Para ello, se infectaron células A549 con 2 ufp/ml con cada uno de los virus y, tras 0, 6, 9, 12 y 24 hpi se recogieron extractos celulares, que se analizaron por *Western blot* usando anticuerpos específicos para la detección de la subunidad PB2 de la polimerasa viral y NS1. Como control de carga se evaluó la cantidad de GAPDH. Como se observa en la **figura R25**, la acumulación de la proteína NS1 es menor que en el WT en todos los casos, especialmente en los virus NS15G y NS15A, sin observarse variaciones importantes en la acumulación de las proteínas PB2 y NP. Estos resultados sugieren que la expresión de la proteína NS1 está afectada por las modificaciones en el nucleótido de la posición 15 del extremo 3'UTR de su vRNA y dichas modificaciones pueden estar afectando al resto de las proteínas virales.

2.2.2. Efecto de las mutaciones en la acumulación de RNAs virales

Como se ha indicado previamente, NS1 está implicada en la regulación de la síntesis del RNA viral. Se ha visto que mutaciones en el vRNA del segmento que codifica esta proteína, generan virus termosensibles que presentan grandes bajadas en la acumulación de su vRNA, sin mostrar bajadas en la acumulación de mRNA o cRNA (Wolstenholme, Barrett et al. 1980), observándose resultados similares en virus que portan mutaciones en el extremo carboxilo terminal de la proteína (Falcon, Marion et al. 2004). Para estudiar si las mutaciones en la región específica de segmento tienen un efecto directo sobre las cinéticas de transcripción y replicación viral, se analizaron los niveles de mRNA y vRNA viral durante la infección por el virus de la gripe, mediante RT-qPCR. Para ello, se pseudoinfectaron o

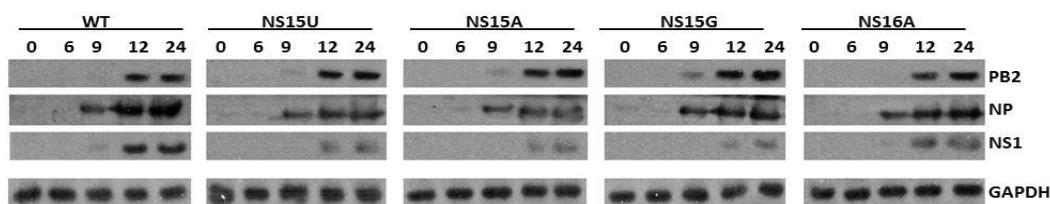


Figura R25. Acumulación de proteínas virales durante la infección del virus de la gripe en células infectadas con los diferentes virus rescatados. Cultivos de células humanas A549 fueron infectados con los virus WT, NS15U, NS15A, NS15G o NS16A a una MDI de 2 ufp/célula. A los tiempos post-infección indicados (hpi) se determinó la acumulación de las proteínas PB2, NP y NS1 por *Western-blot* usando anticuerpos específicos. Se usó GAPDH como control de carga.

infectaron células A549 con cada uno de los virus a una MDI de 2. Posteriormente, se aisló el RNA total y se procedió a la detección y cuantificación por RT-qPCR de los mRNAs y vRNAs virales del segmento NP producidos durante la cinética de infección. Los resultados obtenidos mostraron, a tiempos tempranos de infección, una menor cantidad tanto de RNA genómico (**Fig. R26A**) como de mRNA (**Fig.**

R26B) en el caso de los virus NS15G y NS15A. En ambos virus, la bajada en la cantidad de vRNA (10 veces en el virus NS15G y 5 veces en el virus NS15A, respecto al WT) fue paralela a la bajada en la cantidad de mRNA. Además, a medida que avanzó la infección las diferencias en las cantidades de ambos RNAs respecto al WT fueron disminuyendo hasta prácticamente recuperarse a 9hpi. Estos resultados sugieren que los cambios C15G y C15A, realizados en el extremo 3'UTR del vRNA del segmento NS, son los que más efecto tienen sobre la expresión génica viral. Además, teniendo en cuenta que las mayores diferencias se observan a tiempos tempranos de infección, se deduce una afección sobre eventos tempranos de la infección que son solventados a medida que transcurre ésta, dada la recuperación en las cantidades de RNAs virales.

2.2.3. Estudio de la distribución de las proteínas virales por inmunofluorescencia

Una de las características de la proteína NS1 es su localización subcelular a lo largo del ciclo de infección. La proteína contiene tanto señales de localización (NLS) como de exportación nuclear (NES) (Greenspan,

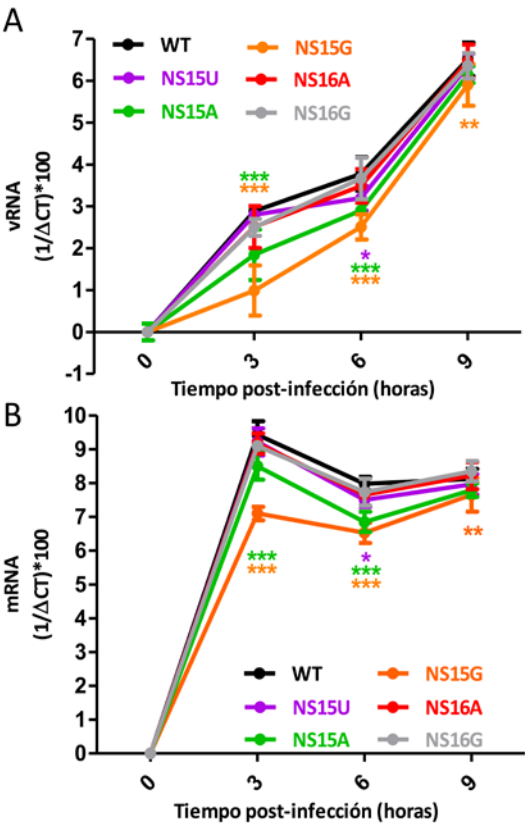


Figura R26. Acumulación de RNAs durante la infección del virus de la gripe en células infectadas con los diferentes virus rescatados. Cultivos de células humanas A549 fueron infectados con los virus WT, NS15U, NS15A, NS15G, NS16A o NS16G a una MDI de 2 ufp/célula. Se recogió el RNA total a 0, 3, 6 y 9 hpi. La acumulación del RNA viral se determinó mediante RT-qPCR usando sondas específicas para el vRNA (**A**) y el mRNA (**B**) del segmento NP. Se presenta la media \pm S.E.M de seis determinaciones independientes.

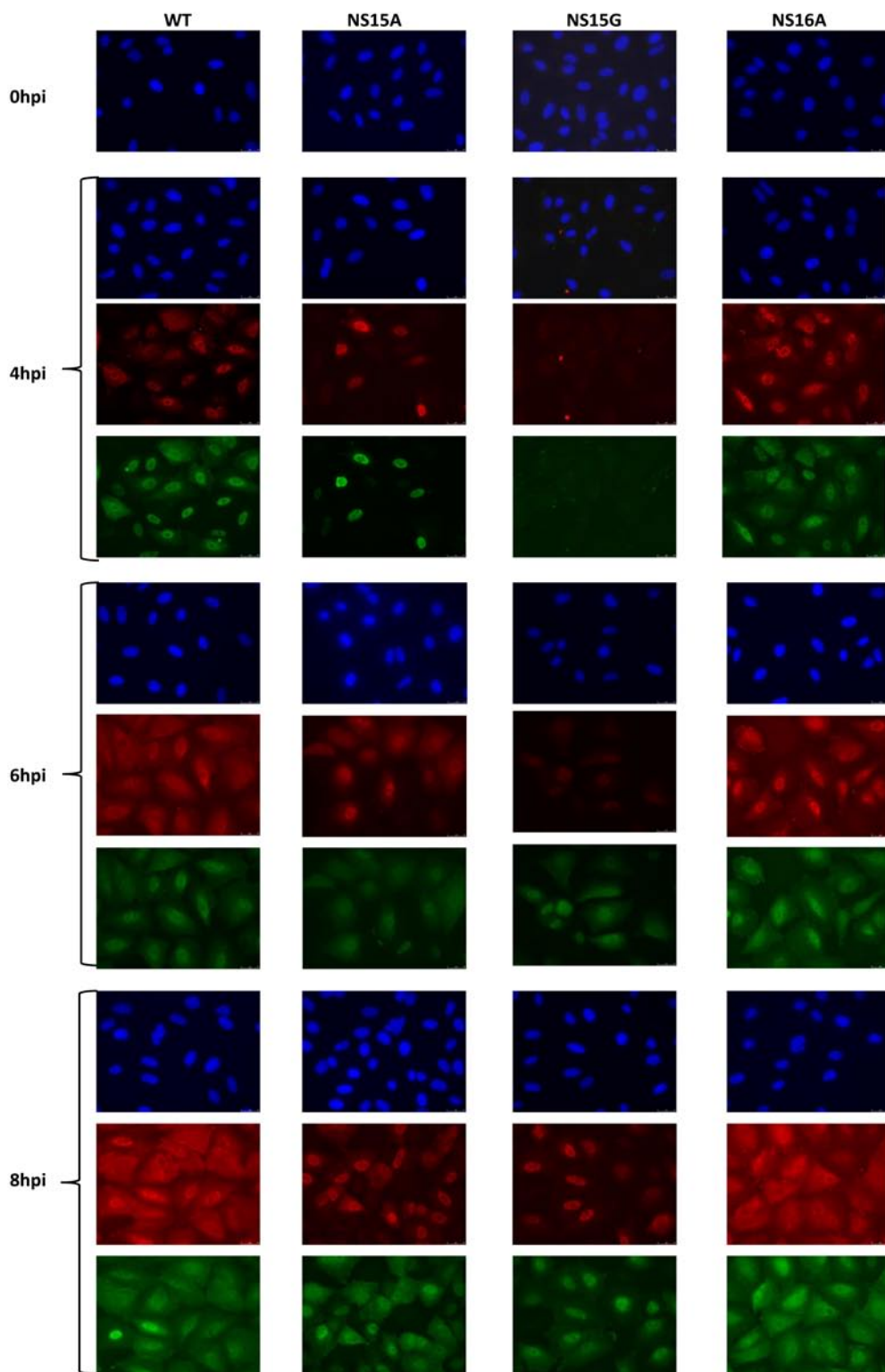


Figura R27. Distribución de las proteínas virales NS1 y NP en infecciones con los virus WT, NS15A, NS15G y NS16A. Se infectaron células humanas A549 con los virus WT, NS15A, NS15G y NS16A a una MDI de 2 ufp/célula y a las horas pos-infección (hpi) indicadas los cultivos se fijaron y se realizó un doble marcaje con anticuerpos específicos de NS1 y NP. Las imágenes presentadas son secciones de microscopía confocal representativas que muestran la presencia del núcleo (DAPI en azul), NS1 (rojo) y NP (verde).

Palese et al. 1988, Li, Yamakita et al. 1998). A tiempos tempranos de la infección NS1 se localiza en el núcleo de la célula infectada, mientras que a tiempos más tardíos se encuentra mayoritariamente en el citoplasma asociada a polisomas (Krug & Etkind 1973, de la Luna, Fortes et al. 1995). Para averiguar si las modificaciones introducidas tienen algún efecto en la distribución subcelular de NS1, se analizó por microscopía confocal la distribución de esta proteína en infecciones a alta MDI (2 ufp/célula) con los virus NS15G y NS15A, dado que son los que presentan un fenotipo más claro. Paralelamente, se analizó la localización subcelular de NP como control de infección. Como virus de referencia, se analizó la distribución de ambas proteínas en infecciones con los virus WT y NS16A. Tal y como se observa en la **Figura R27**, a 4hpi tanto la proteína NS1 (rojo) como la proteína NP (verde) aparecen más tarde en las infecciones realizadas con los virus NS15G y NS15A, lo que sugiere un retraso en la cinética de infección, especialmente en el caso del virus NS15G. Además, tanto a 6 como a 8 hpi, la distribución de NS1 y NP en los virus NS15G y

NS15A es fundamentalmente nuclear, frente a la distribución nuclear y citoplásmica que se observa en los virus de referencia.

Teniendo en cuenta que no se observaron grandes cambios en la acumulación de PB2 y NP por *Western blot* (**Fig. R24**) en los virus NS15G y NS15A, estos resultados indican que las modificaciones NSC15G y NSC15A no sólo producen un retraso en la cinética de infección, sino que también afectan al transporte de las RNPs virales del núcleo al citosol de la célula infectada.

2.2.4. Análisis del título viral

Para determinar si las mutaciones seleccionadas son relevantes en cuanto la producción de partículas infectivas en un único ciclo infectivo, se infectaron cultivos de células A549 a alta MDI con cada uno de los virus rescatados. Se recogieron los sobrenadantes de las células infectadas a varios tiempos post-infección y se determinó el título viral mediante un ensayo de formación de placa en células MDCK. Como puede observarse en la **figura R28**, el virus NS15G produjo una bajada de título de más de un logaritmo y medio, respecto al virus silvestre. Los virus

NS15A y NS15U, produjeron una bajada de un logaritmo respecto al virus silvestre y los virus tomados como referencia (WT y N16A) mostraron un título viral similar.

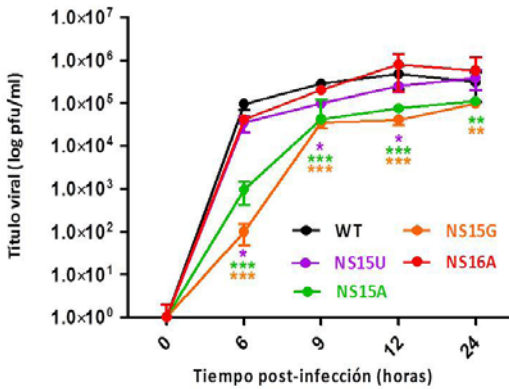


Figura R28. Cinética de replicación del virus de la gripe en células infectadas a alta multiplicidad. Se infectaron cultivos de células humanas A549 con los virus WT, NS15U, NS15A, NS15G o NS16A a una MDI de 2 ufp/célula. A los tiempos post-infección indicados se recogieron los sobrenadante que se usaron para determinar el título viral. Los valores representan la media \pm S.E.M de tres experimentos independientes.

2.3. Cinéticas a baja multiplicidad de infección

Los ensayos a baja multiplicidad de infección, permiten evaluar la capacidad de crecimiento de los diferentes virus en ciclos virales sucesivos. Para su realización, se infectaron monocapas de células A549 a baja MDI (10^{-2} ufp/célula) con los distintos virus generados y con el virus WT. A distintos tiempos post-infección se recogieron los sobrenadantes para analizar su infectividad en células MDCK. En la **figura R29** se muestran

los datos obtenidos en este ensayo. Como se puede observar, tanto el virus NS15A, como el virus NS15G muestran una bajada de título viral respecto al WT de 1.5 y 2 logaritmos, respectivamente. Esta disminución es detectada a tiempos tempranos de infección, observándose una recuperación en la capacidad formadora de partículas infecciosas a medida que progresa la infección.

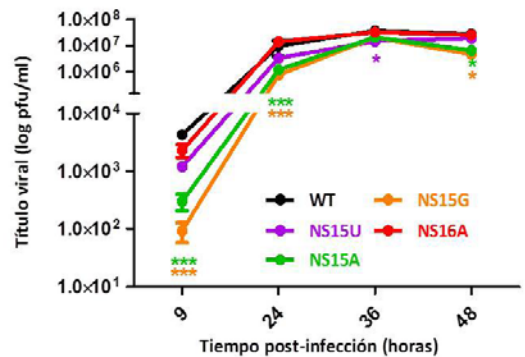


Figura R29. Cinética de replicación del virus de la gripe en células infectadas a baja multiplicidad. Se infectaron cultivos de células humanas A549 con los virus WT, NS15U, NS15A, NS15G o NS16A a una MDI de 0.02 ufp/célula. A los tiempos post-infección indicados se recogieron porciones del sobrenadante que se usaron para determinar el título viral. Los resultados representan la media \pm S.E.M de tres experimentos independientes.

DISCUSIÓN

BÚSQUEDA DE UN ANTIVIRAL EFECTIVO CONTRA EL VIRUS DE LA GRIPE

La alta variabilidad de los virus de la gripe, así como su alta transmisibilidad y su amplio rango de hospedador, se han relacionado con su persistencia en el ser humano y con la dificultad para el control eficaz de la infección por este virus.

Tanto las empresas privadas, como los servicios de salud pública, siguen buscando métodos para combatir al virus de la gripe, sin embargo, las hospitalizaciones o muertes anuales causadas por estos virus siguen siendo altas. Por lo tanto, todavía hay una necesidad urgente de enfoques innovadores para reconocer y prevenir esta enfermedad en sus primeras etapas, especialmente en grupos de alto riesgo.

Aunque la vacunación es el medio más poderoso para la mitigación de los efectos de las epidemias de gripe, los medicamentos antivirales también pueden ser muy útiles, sobre todo en el retraso de la propagación de nuevos virus pandémicos. Los inhibidores de la neuraminidasa, como el oseltamivir,

laninamivir, zanamivir y peramivir son comúnmente utilizados como agentes antivirales para el tratamiento de la infección por el virus de la gripe (Hurt, Hui et al. 2015). Todos estos antivirales son análogos al ácido siálico, cada uno de ellos posee diferencias sutiles en la estructura química y propiedades de unión y, por consiguiente, los patrones de resistencia a ellos varían. Sin embargo, se han descrito virus resistentes a cada uno de estos inhibidores de la neuraminidasa, siendo los más abundantes los resistentes al oseltamivir y peramivir (Hurt, Hui et al. 2015). La rápida aparición de virus resistentes a los fármacos existentes, es una razón de peso para el desarrollo de nuevos fármacos antivirales.

La investigación actual propone varias estrategias para controlar la infección por el virus de la gripe que consisten en (i) mejorar el diseño, la potencia y la vía de administración de los antivirales disponibles, (ii) identificar nuevos compuestos que bloqueen proteínas virales, (iii) bloquear factores celulares importantes para llevar a cabo el ciclo infectivo, (iv) modular la respuesta inmune del hospedador para minimizar el daño de

tejido producido por la infección y (v) la terapia combinada de varios antivirales, que se propone como la mejor forma de minimizar la aparición de virus resistentes.

En la actualidad hay muchos compuestos candidatos sujetos a estudio y hay varios en fase de desarrollo clínico.

1. ANTIVIRALES EN FASE DE DESARROLLO CLÍNICO

De los antivirales en desarrollo cuya diana es una proteína viral el más prometedor es el **Favipiravir** (T-705). Este compuesto fue identificado en 2002 y actualmente se encuentra en fase III de desarrollo clínico en humanos. Es un análogo de nucleósido que inhibe la polimerasa de los géneros *Influenzavirus* A, B y C (Furuta, Gowen et al. 2013). Se ha demostrado que este compuesto inhibe la incorporación de nucleótidos a la hebra de RNA viral naciente (Furuta, Takahashi et al. 2005) y además, se propone que induce mutagénesis letal durante la infección por gripe (Baranovich, Wong et al. 2013).

Por otro lado, otros antivirales están basados en tratar de bloquear vías celulares

importantes para el ciclo infeccioso.

DAS181 es una sialidasa de la bacteria *Actinomyces viscosus* que elimina el ácido siálico de las células epiteliales, bloqueando la interacción con la HA y evitando así la entrada del virus de la gripe a las células epiteliales. Esta sialidasa se ha probado en 297 pacientes en los que se observó una disminución drástica de la propagación viral (Moss, Hansen et al. 2012).

Además de inhibir la entrada del virus, se han generado compuestos que bloquean vías celulares que se activan fuertemente durante la infección por el virus de la gripe como la vía de las quinasas **MAPK/ERK** (Pleschka, Wolff et al. 2001), provocando la retención en el núcleo de las RNPs virales mediante el bloqueo del factor de exportación nuclear NEP. Estos compuestos se encuentran actualmente en fase I de desarrollo en humanos.

2. APTÁMEROS COMO HERRAMIENTA ANTIVIRAL

El hecho de bloquear vías celulares importantes para llevar a cabo el ciclo viral cada vez va cobrando más peso. La ventaja de

bloquear vías celulares importantes para el virus es que el efecto inhibitorio, en principio, no será específico de cepa gripal y, además, se minimizará la aparición de virus resistentes.

Por otra parte, los fármacos basados en ácidos nucleicos son una clase novedosa y prometedora de agentes antivirales. El hecho de haber centrado nuestra atención en los aptámeros como posibles antivirales se debe, en parte, a las ventajas de la metodología SELEX. Uno de los aspectos más interesantes de esta metodología es su gran versatilidad, ya que permite seleccionar aptámeros capaces de discriminar entre moléculas muy relacionadas (Jenison, Gill et al. 1994), de muy distinta naturaleza, y entre diferentes conformaciones de una misma proteína (Rhie, Kirby et al. 2003, Sekiya, Nishikawa et al. 2005). Se han descrito aptámeros frente a moléculas inorgánicas (Hofmann, Limmer et al. 1997), orgánicas de pequeño tamaño (Grate & Wilson 2001), proteínas (Stoltenburg, Reinemann et al. 2005), carbohidratos (Masud, Kuwahara et al. 2004), nucleótidos (Sazani, Larralde et al. 2004), antibióticos (Berens, Thain et al. 2001), e incluso células (Shangguan, Li

et al. 2006, Mallikaratchy, Tang et al. 2007), tejidos y organismos enteros (Chen, Zhou et al. 2007). Los diferentes experimentos SELEX demuestran que la selección es posible para, en principio, cualquier diana que se encuentre en cantidad suficiente. Existe una base de datos con una relación de todos los aptámeros publicados frente a diversas dianas <http://aptamer.icmb.utexas.edu/>. Además, una vez seleccionados, su síntesis es sencilla y poco costosa, además de no haber riesgos de contaminación. La ausencia de capacidad inmunogénica los hacen aún más atractivos.

2.1. Aptámeros contra el virus de la gripe

En los últimos años, se han descrito varios aptámeros contra el virus de la gripe, principalmente destinados a impedir la entrada del virus en la célula mediante el bloqueo de la HA (Jeon, Kayhan et al. 2004, Kwon, Shin et al. 2010, Musafia, Oren-Banaroya et al. 2014, Li, Feng et al. 2016). Otros aptámeros descritos han sido dirigidos contra NS1 (Woo, Kim et al. 2013) o la subunidad PA de la polimerasa (Yuan, Zhang et al. 2015). Sin embargo, el número de aptámeros dirigidos

contra factores de la célula huésped que controlan la actividad viral, es muy limitado. De éstos, el aptámero más destacado es el dirigido contra RIG-I (Hwang, Sun et al. 2012). RIG-I es un receptor citosólico, capaz de detectar RNA exógeno, que media la respuesta inmune contra las infecciones virales a través de la producción de interferón β (β -IFN) (Weber 2015). El aptámero descrito activa RIG-I, bloqueando eficazmente la replicación del virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la estomatitis vesicular y el virus de la gripe en las células infectadas (Hwang, Sun et al. 2012), lo que evidencia que los aptámeros dirigidos contra factores celulares pueden actuar como eficientes agentes antivirales y, de amplio espectro.

3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS APTÁMEROS ApPABP7 y ApPABP11

Teniendo en cuenta que la traducción de los mRNAs virales requiere la maquinaria traduccional celular, se estudió la posibilidad de que aptámeros dirigidos contra un componente del complejo de iniciación de la traducción, la proteína hPABP1, pudieran

servir como posibles agentes antivirales contra el virus de la influenza. hPABP1 juega un papel clave en la traducción del mRNA ya que interacciona con eIF4GI y con la cola de poliadeninas de los mRNAs, permitiendo la circularización de los mRNAs y facilitando así la iniciación de la traducción de los mRNAs poliadenilados (Tarun, Wells et al. 1997, Imataka, Gradi et al. 1998, Gray, Coller et al. 2000, Wakiyama, Imataka et al. 2000).

3.1. Los sitios de unión de ApPABP7 y ApPABP11 a la proteína hPABP1 están muy próximos, pero son diferentes

Diferentes estudios en los que se ha mapeado hPABP1, han demostrado que los dominios de hPABP1 que median su interacción con el complejo eIF4GI y la proteína NS1 del virus, residen en las posiciones 1-175 y 365-535, respectivamente. Los aptámeros específicos utilizados en este estudio interaccionan con hPABP1 entre los aminoácidos 307 y 364 de hPABP1, una región en el cuarto dominio RRM cerca de la región con la que interacciona con NS1. El aptámero ApPABP11 inhibe la interacción NS1-PABP1 y la de la proteína PABP1 con la cola de poli(A)

in vitro. Sin embargo, el ApPABP7 no inhibe estas interacciones, por lo que las regiones de interacción de estos dos aptámeros, aunque son muy próximas, son distintas. Es interesante señalar que los dos aptámeros, principalmente el ApPABP11, muestran una menor unión a los mutantes de delección de hPABP1 que a la proteína completa. Estos resultados indican claramente que son necesarios todos los dominios para preservar la estructura tridimensional correcta de hPABP1 y que, a su vez, es necesaria para la unión de aptámeros si bien son necesarios más experimentos para mapear los sitios exactos de interacción de ambos aptámeros en PABP1.

3.2. hPABP1 podría asociarse a la cola de poli(A) de los mRNAs virales y a la subunidad PB2 de la polimerasa viral.

La polimerasa del virus de la gripe, es un complejo de unión a cap (Resa-Infante, Jorba et al. 2011), que se asocia con el complejo de iniciación de la traducción a través de la interacción directa entre la subunidad PB2 y la proteína eIF4G1. Esta interacción es consistente con el hecho de que la traducción del mRNA

viral es totalmente independiente del factor celular de unión a cap eIF4E, lo que sugiere que el complejo de la polimerasa viral se une a las secuencias conservadas del extremo 5'UTR del mRNA viral y puede funcionar como un factor específico de unión a cap, y de este modo dirigir la traducción de mRNAs virales (Burgui, Yanguéz et al. 2007, Yanguéz & Nieto 2011). En células transfectadas con ambos aptámeros e infectadas con el virus de la gripe, los anticuerpos que detectan hPABP1 son capaces de inmunoprecipitar PB2 y, estos inmunocomplejos están prácticamente libres de eIF4G1. Si bien es cierto, PB2 se co-inmunoprecipitó ligeramente menos en presencia del ApPABP11 (**Fig. R19**).

Estos resultados sugieren que PB2 co-inmunoprecipita con hPABP1 como un componente de la polimerasa viral asociada con los mRNAs virales poliadenilados así, se propone que hPABP1 y PB2 existirían en los mismos complejos, donde hPABP1 estaría unida a la cola de poli(A) y PB2 al extremo 5'UTR de los mRNAs virales. Estos resultados podrían indicar además, que la polimerasa viral acompaña a los mRNAs virales citosólicos

para impulsar su traducción selectiva (**Figura R19**). La pequeña bajada en la cantidad de PB2 que se ha observado en presencia del ApPABP11, es consistente con la inhibición de la interacción PABP1-poli(A). Por otro lado, el aptámero ApPABP11, podría estar inhibiendo la interacción NS1-PABP1, mediante el bloqueo directo de la asociación entre NS1 y PABP1 o de la asociación entre NS1 y el mRNA viral.

3.3. Los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11 inhiben la interacción eIF4GI-PB2

Los resultados presentados en la **figura R19** muestran que aquellas células transfectadas con el ApPABP7 o con el ApPABP11 presentan menos cantidad de PB2 en los inmunocomplejos obtenidos con anticuerpos contra eIF4GI, que aquellas células transfectadas con el ApControl o células no transfectadas. Estos inmunocomplejos además de eIF4GI, contienen PABP1 y, probablemente, representan complejos de iniciación de traducción. La inhibición de la interacción eIF4GI-PB2 por el ApPABP7 y el ApPABP11 podría ser debida a que estos aptámeros modifican de algún modo a los

complejos que contienen eIF4GI-PABP1, ya que estos aptámeros no inhiben la asociación eIF4GI-PABP1.

En la **figura D1** se presenta un modelo de hPABP1 libre (**Fig. D1A**) o asociada en complejos de traducción, junto con el efecto del ApControl (**Fig. D1C**) o de los aptámeros específicos contra hPABP1 (**Fig. D1B**) en la inmunoprecipitación de la proteínas (IPP) usando anticuerpos específicos contra hPABP1 o eIF4GI.

Teniendo en cuenta que ambos aptámeros que reconocen la hPABP1, disminuyen la producción de partículas infecciosas de manera similar y, que el ApPABP7 afecta a la asociación PB2-eIF4GI, sin alterar la unión entre NS1 y eIF4GI, podría sugerirse que la interacción de la polimerasa viral con eIF4GI juega un papel importante en el control de la traducción del mRNA del virus de la gripe.

4. EL ApPABP7, UN ANTIVIRAL PROMETEDOR

Para utilizar los compuestos *in vivo*, es necesario evaluar su índice de selectividad (IS) así como otra serie de parámetros ya

mencionados en la memoria. El IS, medido como inhibición de la actividad traduccional, es de 7.5 para el aptámero ApPABP7, lo que indica que aún se puede aumentar en 7.5 veces (hasta 1050 nM) la concentración empleada hasta reducir en un 50% la tasa de síntesis de proteínas celulares.

Estos datos indican que el aptámero ApPABP7 podría reducir el rendimiento de virus de la gripe a concentraciones que no afectan a la viabilidad celular, de modo que representa una herramienta prometedora

para ser probado como un medicamento contra la gripe en modelos animales. En cualquier caso, cabe destacar que en ningún momento se alcanzó la CC_{50} de ninguno de los dos aptámeros y, muy probablemente, se esté infravalorando su potencial antiviral.

La estabilidad, periodicidad de la administración requerida para alcanzar la concentración adecuada en los pulmones, así como la vía de administración, son parámetros adicionales que deben ser considerados para poder utilizar los aptámeros *in vivo*.

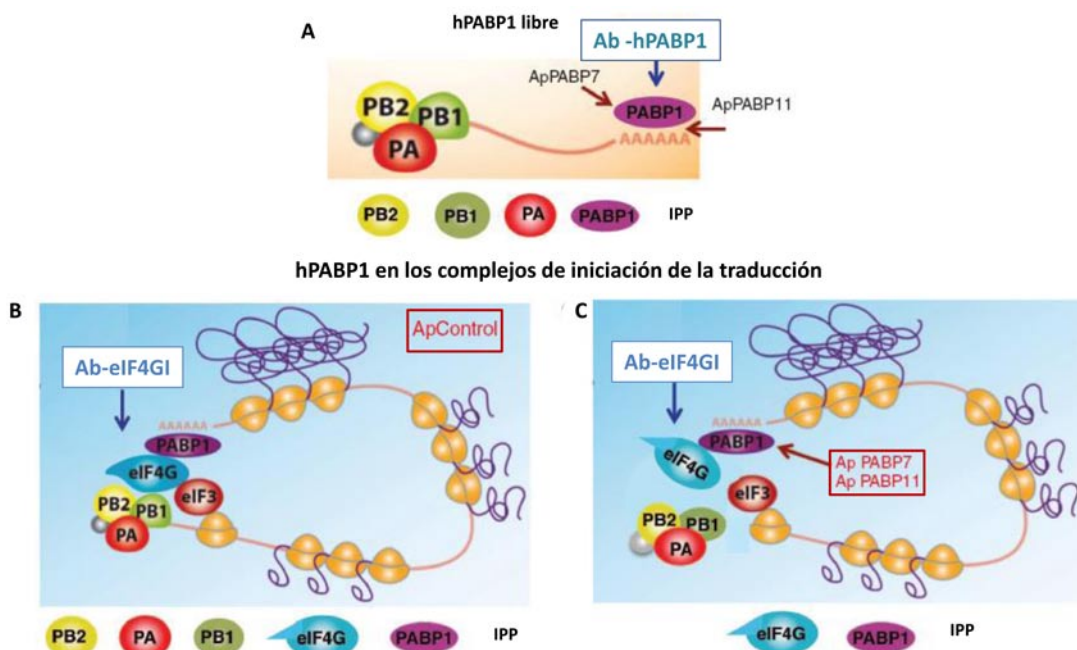


Figura D1. Modelo del mecanismo de acción de los aptámeros que reconocen hPABP1 y afectan a la asociación de proteínas del virus de la gripe con las proteínas celulares hPABP1 y eIF4GI. hPABP1 podría existir en dos formas: independiente (A) o asociada a los factores de iniciación de la traducción (B-C). En la forma libre (A), el anticuerpo de hPABP1 co-inmunoprecipitaría las subunidades de la polimerasa del virus de la gripe junto con hPABP1; la polimerasa viral unida a la estructura cap del extremo 5'UTR del mRNA viral y hPABP1 a la cola de poliadeninas del extremo 3'UTR de estos mRNAs. B) En la población de hPABP1 asociada en los complejos de traducción, el anticuerpo de eIF4GI co-inmunoprecipitaría las subunidades de la polimerasa, hPABP1 y eIF4GI, en las células transfectadas con el ApControl. C) en la población de hPABP1 asociada en los complejos de traducción, las células transfectadas con el ApPABP7 y el ApPABP11 tendría perturbados los complejos que contienen el factor eIF4GI, bloqueando la asociación de la polimerasa viral con eIF4GI. IPP: proteínas inmunoprecipitadas.

Las dianas intracelulares son difíciles de alcanzar en las células vivas y el problema se hace aún más difícil para la administración de moléculas de DNA/RNA *in vivo*. Aunque algunos aptámeros pueden entrar en la célula de una manera mediada por receptor, normalmente son transportados a través de algún sistema de vehiculización. Los liposomas se están convirtiendo en una de las clases más versátiles de reactivos para la administración de la terapéutica basada en aptámeros (Fattal, Dubernet et al. 2001). Durante los últimos años, los conjugados aptámero-nanopartícula forman la base de una nueva estrategia química y biológica con amplia aplicación. Debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas pueden interaccionar fácilmente con biomoléculas tanto en la superficie, como dentro de las células y, por lo tanto, se les considera como un enfoque revolucionario para el tratamiento de diversas enfermedades (Kanwar, Roy et al. 2011).

La búsqueda de compuestos antivirales contra virus de la gripe es un campo muy activo dado que virus de la gripe constituye un problema de salud continua para los seres

humanos. Al igual que otros enfoques para combatir los virus, como el VIH o la hepatitis C, la acción combinada de varios medicamentos claramente ayuda para contrarrestar de manera eficiente estos patógenos. Los aptámeros amplían la lista de medicamentos disponibles contra el virus de la gripe que potencialmente pueden ayudar a reducir la propagación de este virus.

ESTUDIO DE LA REGIÓN ESPECÍFICA DE SEGMENTO DEL VIRUS DE LA GRIPE

La generación de los diferentes tipos de RNA viral, así como el empaquetamiento de los RNAs en los viriones (Luytjes, Krystal et al. 1989), la expresión temporal de cada una de las proteína virales (Skehel 1973, Inglis, Carroll et al. 1976, Lamb & Choppin 1976, Inglis & Mahy 1979, Shapiro, Gurney et al. 1987), y la modulación del proceso de *splicing* (Zheng, Wang et al. 2015), dependen de señales en cis que se han encontrado en la región no codificante de ambos extremos de los diferentes segmentos virales. Clásicamente se ha atribuido a la región promotora las funciones de regulación de los procesos de transcripción y replicación virales, principalmente debido a la conformación estructural que adquiere. Sin embargo, se ha documentado que la región específica de segmento modula activamente la actividad del promotor viral (Bergmann & Muster 1996, Zheng, Palese et al. 1996). De este modo, aunque la región específica de segmento no forma parte del promotor, contribuye a su estructuración adecuada, lo

que podría estar relacionado con la capacidad de modular la actividad del promotor viral.

En este contexto, las modificaciones introducidas en la región específica de segmento de NS, pueden tener un efecto directo sobre la modificación de la estructura del promotor viral, afectando a la funcionalidad de las proteínas que codifica, NS1 y NEP.

1. FUNCIONES DE LA PROTEÍNA VIRAL NS1

NS1 es una proteína no estructural de pequeño tamaño, entre 230-238 aminoácidos según la cepa de virus, y un peso molecular de 26 kDa aproximadamente (Palese, P. & Shaw, 2007). Sin embargo, se caracteriza por su gran multifuncionalidad gracias a las múltiples interacciones que establece, tanto con RNAs (Garfinkel & Katze, 1993; Hatada & Fukuda, 1992; Hatada *et al.*, 1992, 1997; Lu *et al.*, 1994; Qiu & Krug, 1994; Qiu *et al.*, 1995; Wang & Krug, 1998; Wang *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 1981), como con proteínas celulares y virales. Su papel fundamental es contrarrestar la respuesta antiviral, aunque es un factor de regulación clave durante la infección,

que afecta la expresión génica celular y viral (García-Sastre, 2001; Hale *et al.*, 2008; Krug *et al.*, 2003). A continuación se resumen brevemente sus principales funciones:

1.1. Control de la maquinaria de defensa celular

NS1 impide la activación de la PKR a través de su unión a RNAs de doble cadena o dsRNA (Cheng, Wong *et al.* 2009) o mediante la interacción directa entre NS1 y PKR (Tan & Katze 1998, Hatada, Saito *et al.* 1999). Además, NS1 tiene la capacidad de inhibir el sistema de silenciamiento celular mediado por RNA interferente (Bucher, Hemmes *et al.* 2004, Li, Li *et al.* 2004), previene la activación del sistema 2'-5' OAS/RNaseL (Min & Krug 2006), así como la transcripción de los factores IRF3, IRF7, NFκB y Jun/ATF2 mediante la unión a RIG-I (Pichlmair, Schulz *et al.* 2006, Guo, Chen *et al.* 2007, Mibayashi, Martínez-Sobrido *et al.* 2007).

1.2. Participación en la morfogénesis viral

Atendiendo al fenotipo de virus termosensibles, se le ha asignado a NS1 una implicación en etapas tardías de la

morfogénesis viral (Garaigorta, Falcon *et al.* 2005).

1.3. Inhibición del procesamiento y el transporte de los mRNAs celulares

NS1 es capaz de inhibir el *splicing* de los mRNAs celulares (Qiu, Nemeroff *et al.* 1995) y de impedir su maduración mediante la inhibición del corte y la poliadenilación de su extremo 3' (Chen, Li *et al.* 1999). Además, NS1 es responsable de la retención nuclear de mRNAs celulares poliadenilados que se transcriben bajo el control de la RNA polimerasa II celular. Estas acciones van encaminadas a lograr el bloqueo de la traducción de los mRNAs celulares (*shut off* celular) (Park & Katze 1995) frente la estimulación traduccional de los mRNAs virales. Además, de este modo el virus de la gripe también logra contrarrestar en buena medida la respuesta inmune celular, dado que la producción de interferón se ve mermada.

1.4. Modulación del proceso de splicing de los mRNAs virales

NS1 inhibe el *splicing* de los mRNAs celulares y, aunque la regulación del *splicing* de su propio segmento es algo controvertida

(Fortes, Beloso et al. 1994, Garaigorta & Ortin 2007, Robb, Jackson et al. 2010, Robb & Fodor 2012), sí modula el *splicing* del segmento 7 (Robb & Fodor 2012)

1.5. Modulación de la actividad de la polimerasa viral

NS1 interacciona con el RNA viral (Hatada & Fukuda 1992, Hatada, Takizawa et al. 1992, Hatada, Saito et al. 1997, Marion, Aragon et al. 1997) y con la polimerasa viral y/o las RNPs (Marion, Aragon et al. 1997) durante la infección. Estos datos junto con estudios de virus termosensibles mutantes en NS1 (Falcon, Marion et al. 2004, Garaigorta, Falcon et al. 2005) sugieren que NS1 podría estar implicada en la modulación de la polimerasa viral.

1.6. Estimulación de la traducibilidad de los mRNAs virales

Como se ha mencionado, durante la infección viral se produce una disminución de la traducción de proteínas celulares (Park & Katze 1995) mientras se da una traducción selectiva de los mRNAs virales. Se ha identificado que la región 5'UTR del mRNA viral (3'UTR del vRNA) es importante en este

proceso (Garfinkel & Katze 1993). Los 14-15 nucleótidos no traducidos, presentes en todos los segmentos del virus de la gripe, son necesarios para la estimulación traduccional.

Los siguientes nucleótidos hasta el codón AUG iniciador modulan el grado de estimulación, de manera que unos mensajeros son más estimulados que otros (Enami, Sato et al. 1994, de la Luna, Fortes et al. 1995). Además, esta región 5'UTR del mRNA permite modular la expresión temporal de los mensajeros virales. La proteína NS1 se ha identificado como un factor de unión al 5'UTR de los mensajeros virales (Park & Katze 1995) que participa en la traducción de los mismos.

2. FUNCIONES DE LA PROTEÍNA VIRAL NEP

Se han asignado dos funciones fundamentales a la proteína NEP:

2.1. Regulación de los procesos de transcripción y replicación del RNA viral

Ensayos de reconstitución de RNPs expresando NEP, muestran una reducción de los productos de la transcripción, frente a un aumento de los productos de replicación

(Robb, Smith et al. 2009).

2.2. Salida de las RNPs progenie al citoplasma

NEP interacciona con el receptor de exportación nuclear CRM1 y con varias nucleoporinas, (O'Neill, Talon et al. 1998, Neumann, Hughes et al. 2000), permitiendo la salida de las RNPs al citoplasma de la célula infectada.

3. LOS VIRUS NS15A Y NS15G, POSEEN UNA CINÉTICA DE INFECCIÓN RETRASADA Y UNA RETENCIÓN NUCLEAR DE PROTEÍNAS VIRALES

El análisis de la acumulación y distribución de proteínas virales en los virus recombinantes mostró una menor expresión de NS1 a lo largo del tiempo en los virus NS15U, NS15A y NS15G, sin cambios en la acumulación de PB2 y NP a partir de 9hpi (**Fig. R25**). En los ensayos de inmunofluorescencia (**Fig. R27**) se observó una baja acumulación de NP en los virus NS15A y NS15G a tiempos tempranos de infección, para después recuperarse a lo largo del ciclo infectivo. Por otro lado, aunque el grado de expresión pudiera recuperarse, la distribución

tanto de NP como de NS1 está alterada, ya que a 8hpi se detecta una retención nuclear de ambas proteínas.

Paralelamente, el análisis del vRNA y del mRNA del segmento NP mostró una menor cantidad de ambos RNAs, fundamentalmente a tiempo temprano de infección, en el virus NS15G, seguido del virus NS15A (**Fig. R26**).

Estos hechos, unido a una disminución del título viral fundamentalmente a tiempos tempranos de infección, tanto a alta (**Fig. R28**) como a baja (**Fig. R29**) multiplicidad de infección, con una posterior recuperación del título viral indican afecciones a tiempos tempranos del ciclo infectivo.

3.1. La funcionalidad de la polimerasa viral permanece intacta

La menor acumulación de NS1 durante todo el ciclo infectivo, podría deberse a un fallo en los procesos de transcripción y/o replicación del mRNA del segmento 8 debido a que los nucleótidos próximos a la región promotora pueden estar fomentando o inhibiendo la formación de la estructura de *panhandle* así como la de *crorkscrew*, bien a través de la interacción con la región

conservada o generándose estructuras internas. En este contexto, la predicción de estructuras reveló una alteración de ambas conformaciones con la introducción de mutaciones, fundamentalmente en la posición 15 (**Fig. R21**). Esta alteración de la estructura del promotor reveló no ser importante para el reconocimiento del RNA mutado por la polimerasa viral, ya que en los ensayos de reconstitución de RNPs, todos los mutantes generados mostraron una acumulación de proteína CAT y de los diferentes RNAs virales, similar a los del WT (**Fig. R22**), indicando que la actividad transcritiva o replicativa de ésta permanece intacta en un contexto fuera de la infección y en condiciones saturantes de polimerasa.

3.2. El transporte nucleo-citosólico del mRNA del segmento 8 no debería estar alterado

El virus de la gripe utiliza las vías de exportación nuclear de la célula para expresar sus genes. La interacción entre la maquinaria transcripcional de la célula y el virus, no sólo aporta el extremo 5'cap empleado como cebador para el inicio de la

transcripción viral, sino que también permite la maduración y la exportación de los mRNAs al citosol (Ball 2007). Aunque hay pocos datos sobre este mecanismo y, a menudo resultan contradictorios, actualmente se acepta que los mRNAs virales salen al citoplasma celular a través de mecanismos diferentes en función de si se trata de mRNAs que carecen de intrones o no han sufrido *splicing*, frente aquellos que sí han sido procesados (York & Fodor 2013).

Aunque no se puede descartar que la introducción de mutaciones puntuales en la secuencia del extremo 3'UTR del vRNA del segmento 8 (5'UTR del mRNA) altere la exportación de los mRNAs de NS1 y/o NEP disminuyendo así su grado de expresión (**Fig. R25**), se presenta como una opción poco probable dado que aunque esta función de NS1 estuviera mermada, existen otros mecanismos de exportación mayoritarios.

3.3. La traducción del mRNA del segmento 8 podría estar alterada

Como se ha mencionado anteriormente, la síntesis de proteínas virales durante la infección por el virus de la gripe, cambia a lo

largo del tiempo (Skehel 1973, Inglis, Carroll et al. 1976, Lamb & Choppin 1976, Inglis & Mahy 1979, Shapiro, Gurney et al. 1987). La región específica de segmento del extremo 3'UTR, junto con el cuarto nucleótido variable presente en la región conservada del extremo 3'UTR del vRNA, cooperan modulando la expresión de proteínas durante la infección (Garfinkel & Katze 1993). Adicionalmente, la proteína NS1 se ha identificado como un factor de unión al 5'UTR de los mensajeros virales (Park & Katze 1995) que participa en la traducción de los mismos. La baja acumulación de proteína NS1 (**Fig. R25**) en los virus NS15A y NS15G, fundamentalmente, apoyan la hipótesis de una menor traducibilidad o una traducción más tardía de los mRNAs del segmento NS que portan estas mutaciones.

3.4. El transporte de las RNPs virales es deficitario

La traducción deficitaria o tardía, de los mRNAs del segmento 8, implicaría una menor acumulación de proteína NEP a lo largo de la infección y, aunque se carece de esta información, los resultados obtenidos en las inmunofluorescencias (**Fig. R27**) indican una

clara retención nuclear tanto de NS1 como de NP, lo que sugiere una retención nuclear de las RNPs virales. Estas RNPs, podrían ser liberadas poco a poco a través del poro nuclear permitiendo la recuperación del título viral a lo largo del tiempo (**Figs. R28 y R29**).

En conjunto, los resultados obtenidos apoyan que la modificación del nucleótido 15 del extremo 3'UTR del vRNA del segmento 8 del virus de la gripe, provoca una disminución en la síntesis de la proteína NS1 y, presumiblemente también en la de NEP. Esta menor acumulación de proteínas podría ser debida a deficiencias en los procesos de transcripción y/o replicación del segmento 8 en el contexto de la infección viral. Aunque en los ensayos de RNPs los moldes modificados fueron bien reconocidos, debe tenerse en cuenta que los componentes de las RNPs están en exceso en este tipo de ensayos y, que la actividad de la polimerasa se produce fuera del contexto de infección. De igual modo, el transporte de los mRNAs del segmento 8, o su traducibilidad, pueden ser deficitarios. Como se ha indicado, la región específica de segmento del extremo 3'UTR

de los vRNAs está implicada en la modulación de la traducción de mRNAs virales. En este contexto, son necesarios más experimentos para poder determinar cuál es el mecanismo que está afectando a la síntesis de NS1 y, presumiblemente de NEP.

Independientemente del mecanismo que esté afectado, a tiempos tempranos de infección la cantidad de NS1 y NEP acumulada tanto en el núcleo como en el citosol, sería menor en los virus NS15A y NS15G, provocando un retraso en la cinética

de infección de estos virus por afectar directamente a las funciones que realizan ambas proteínas (**Fig. D2**). A medida que la infección progresa, la acumulación de NS1 y NEP seguiría siendo más baja que en el caso del virus WT, pero podría ser suficiente como para que ambos virus alcanzase un título viral similar al del WT.

4. LA REGIÓN NO TRADUCIDA DEL SEGMENTO 7 DEL VIRUS DE LA GRIPE

Con el fin de delimitar el efecto de las mutaciones sobre la región específica de

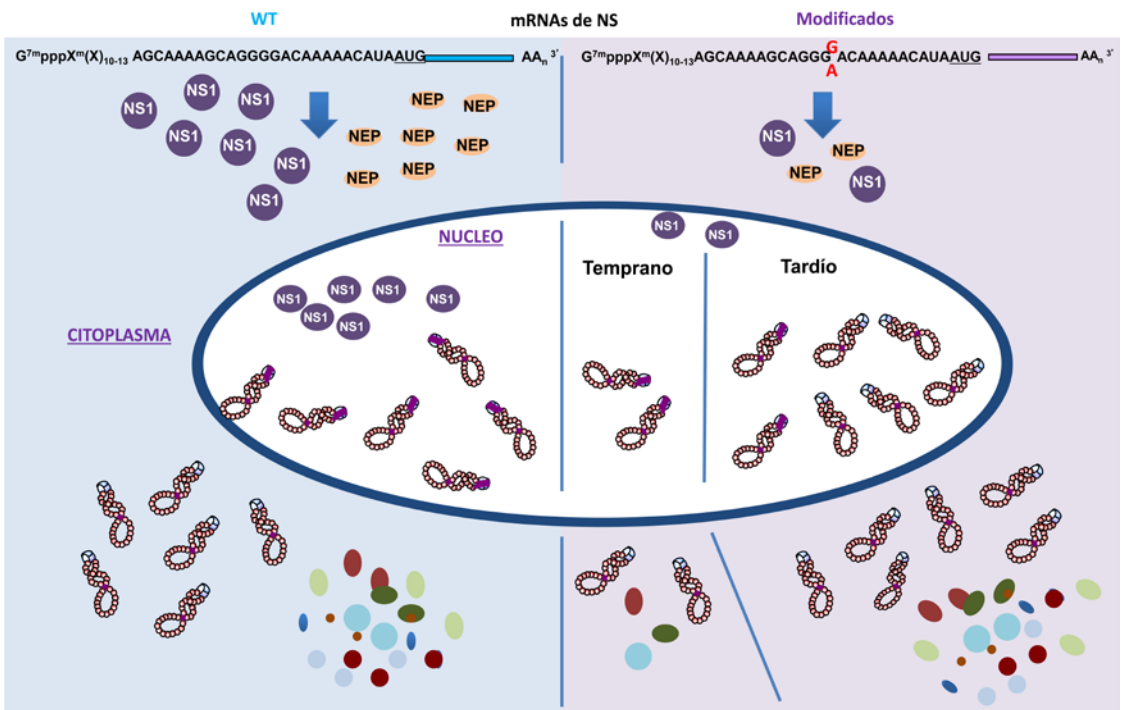


Figura D2. Modelo de expresión del segmento 8 en virus que contienen mutaciones en la región específica de este segmento. Las proteínas NS1 y NEP se sintetizan en menor cantidad en los virus modificados debido a deficiencias en mecanismos, aún por determinar, que regulan la expresión del segmento 8. La menor acumulación de ambas proteínas provoca una menor cantidad de proteínas virales y, consecuentemente de RNPs, a tiempos tempranos de infección. A tiempos tardíos, la síntesis de las proteínas NS1 y NEP continúa siendo baja pero, permite una recuperación del resto de los componentes virales. Se representa el mRNA del virus WT (azul) y de los virus NS15A y NS15G (morado). Los círculos de colores representan las proteínas virales acumuladas a lo largo de la infección.

segmento, se han comenzado a realizar una batería de mutantes en el segmento 7, que portan todas las variaciones posibles en los nucleótidos de las posiciones 14 a 17 del extremo 3' del vRNA. En este caso, los nucleótidos 14 y 15 siguen formando parte de la estructura del promotor viral, apareando con los nucleótidos 15 y 16 del extremo 5' del vRNA (**Fig. D3**). Resultados preliminares obtenidos en ensayos de reconstitución de RNPs similares a los descritos en esta Memoria, no muestran afecciones en la actividad transcriptiva y replicativa en ninguna de las modificaciones introducidas (resultados no mostrados). De igual modo, los ensayos de transfección-infección muestran mutaciones candidatas a tener un efecto sobre el virus, fundamentalmente aquéllas localizadas en los nucleótidos 14 y 15, aunque también

presentan efecto las de los nucleótidos 16 y 17, indicando una afección en algún punto del ciclo viral o en algún proceso mediado por la interacción con proteínas virales o celulares.

Los resultados recogidos en esta memoria, permite asegurar que modificaciones en las regiones no traducidas, modulan la expresión de su propio segmento. No obstante, habrá que esperar a nuevos trabajos que ayuden a entender definitivamente el papel de estas regiones en el ciclo replicativo del virus, así como su uso potencial como vacunas generadas a partir de virus atenuados. Del mismo modo, la continuidad del estudio de los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11, permitirán avanzar en el diseño de una terapia antiviral que controle eficazmente la infección por el virus de la gripe.

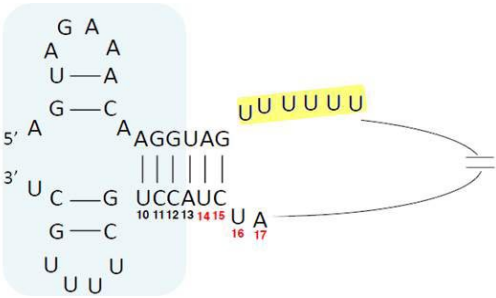


Figura D3. Estructura de la conformación de corkscrew de la región no codificante del vRNA del segmento M del virus de la gripe. El recuadro azul señala la región promotora. En amarillo se muestra la señal de poliadenilación. En rojo se numeran las posiciones de los nucleótidos objeto de estudio.

CONCLUSIONES

De los datos obtenidos en esta Tesis se proponen las siguientes conclusiones:

1. Aptámeros que reconocen a la proteína hPABP1, inhiben la traducción de proteínas celulares moderadamente y más eficazmente la traducción de proteínas del virus de la gripe.
2. Los aptámeros ApPABP7 y ApPABP11 inhiben la replicación del virus de la gripe tanto a alta como a baja multiplicidad de infección en cepas de los subtipos H1N1 y H3N2.
3. Ambos aptámeros inhiben la interacción de la subunidad PB2 de la polimerasa del virus de la gripe con el factor de iniciación de la traducción eIF4GI. El aptámero ApPABP11 inhibe además la interacción de NS1 con el factor eIF4GI y con la proteína hPABP1.
4. Mutaciones que afectan a las posiciones 15-18 del extremo 3'UTR de la región específica de segmento, del segmento 8 del virus de la gripe, no afectan a su reconocimiento por la polimerasa viral fuera del contexto de la infección.
5. Virus recombinantes conteniendo mutaciones en el nucleótido 15 del extremo 3'UTR del segmento 8 del virus de la gripe, presentan menos título viral tanto a alta como a baja multiplicidad de infección, particularmente a tiempos tempranos de la infección.
6. Virus recombinantes conteniendo mutaciones en el nucleótido 15 del extremo 3'UTR del segmento 8 del virus de la gripe, tienen reducida la acumulación de NS1, retrasan la síntesis de otras proteínas virales y producen retención nuclear de las RNPs virales, en un único ciclo de infección.

BIBLIOGRAFÍA

A

Ali, A., R. T. Avalos, E. Ponimaskin and D. P. Nayak (2000). "Influenza virus assembly: effect of influenza virus glycoproteins on the membrane association of M1 protein." *J Virol* **74**(18): 8709-8719.

Aragon, T., S. de la Luna, I. Novoa, L. Carrasco, J. Ortin and A. Nieto (2000). "Eukaryotic translation initiation factor 4G1 is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus." *Mol Cell Biol* **20**(17): 6259-6268.

Arranz, R., R. Coloma, F. J. Chichon, J. J. Conesa, J. L. Carrascosa, J. M. Valpuesta, J. Ortin and J. Martin-Benito (2012). "The structure of native influenza virion ribonucleoproteins." *Science* **338**(6114): 1634-1637.

Avalos, R. T., Z. Yu and D. P. Nayak (1997). "Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells." *J Virol* **71**(4): 2947-2958.

B

Bae, S. H., H. K. Cheong, J. H. Lee, C. Cheong, M. Kainosho and B. S. Choi (2001). "Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(19): 10602-10607.

Ball, L. A. (2007). *Virus replication strategies*.

Baranovich, T., S. S. Wong, J. Armstrong, H. Marjuki, R. J. Webby, R. G. Webster and E. A. Govorkova (2013). "T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro." *J Virol* **87**(7): 3741-3751.

Barcena, J., M. Ochoa, S. de la Luna, J. A. Melero, A. Nieto, J. Ortin and A. Portela (1994). "Monoclonal antibodies against influenza virus PB2 and NP polypeptides interfere with the initiation step of viral mRNA synthesis in vitro." *J Virol* **68**(11): 6900-6909.

Baudin, F., C. Bach, S. Cusack and R. W. Ruigrok (1994). "Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent." *Embo j* **13**(13): 3158-3165.

Beaton, A. R. and R. M. Krug (1984). "Synthesis of the templates for influenza virion RNA replication in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(15): 4682-4686.

Beaton, A. R. and R. M. Krug (1986). "Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end." *Proc Natl*

Acad Sci U S A **83**(17): 6282-6286.

Belsham, G. J. and N. Sonenberg (2000). "Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins." *Trends Microbiol* **8**(7): 330-335.

Berens, C., A. Thain and R. Schroeder (2001). "A tetracycline-binding RNA aptamer." *Bioorg Med Chem* **9**(10): 2549-2556.

Bergmann, M. and T. Muster (1996). "Mutations in the nonconserved noncoding sequences of the influenza A virus segments affect viral vRNA formation." *Virus Res* **44**(1): 23-31.

Biswas, S. K., P. L. Boutz and D. P. Nayak (1998). "Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins." *J Virol* **72**(7): 5493-5501.

Biswas, S. K. and D. P. Nayak (1996). "Influenza virus polymerase basic protein 1 interacts with influenza virus polymerase basic protein 2 at multiple sites." *J Virol* **70**(10): 6716-6722.

Blaas, D., E. Patzelt and E. Kuechler (1982). "Identification of the cap binding protein of influenza virus." *Nucleic Acids Res* **10**(15): 4803-4812.

Bortz, E., L. Westera, J. Maamary, J. Steel, R. A. Albrecht, B. Manicassamy, G. Chase, L. Martinez-Sobrido, M. Schwemmle and A. Garcia-Sastre (2011). "Host- and strain-specific regulation of influenza virus polymerase activity by interacting cellular proteins." *MBio* **2**(4).

Bouloy, M., S. J. Plotch and R. M. Krug (1978). "Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**(10): 4886-4890.

Braam, J., I. Ulmanen and R. M. Krug (1983). "Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription." *Cell* **34**(2): 609-618.

Briedis, D. J., G. Conti, E. A. Munn and B. W. Mahy (1981). "Migration of influenza virus-specific polypeptides from cytoplasm to nucleus of infected cells." *Virology* **111**(1): 154-164.

Bright, R. A., M. J. Medina, X. Xu, G. Perez-Oronoz, T. R. Wallis, X. M. Davis, L. Povinelli, N. J. Cox and A. I. Klimov (2005). "Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern." *Lancet* **366**(9492): 1175-1181.

Bright, R. A., D. K. Shay, B. Shu, N. J. Cox and A. I. Klimov (2006). "Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-

2006 influenza season in the United States." Jama **295**(8): 891-894.

Brownlee, G. G. and J. L. Sharps (2002). "The RNA polymerase of influenza A virus is stabilized by interaction with its viral RNA promoter." J Virol **76**(14): 7103-7113.

Bucher, E., H. Hemmes, P. de Haan, R. Goldbach and M. Prins (2004). "The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants." J Gen Virol **85**(Pt 4): 983-991.

Burgui, I., T. Aragon, J. Ortin and A. Nieto (2003). "PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes." J Gen Virol **84**(Pt 12): 3263-3274.

Burgui, I., E. Yanguéz, N. Sonenberg and A. Nieto (2007). "Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation?" J Virol **81**(22): 12427-12438.

Bushell, M. and P. Sarnow (2002). "Hijacking the translation apparatus by RNA viruses." J Cell Biol **158**(3): 395-399.

C

Colman, P. M., J. N. Varghese and W. G. Laver (1983). "Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase." Nature **303**(5912): 41-44.

Coloma, R., J. M. Valpuesta, R. Arranz, J. L. Carrascosa, J. Ortin and J. Martin-Benito (2009). "The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex." PLoS Pathog **5**(6): e1000491.

Compans, R. W. and P. W. Choppin (1975). Reproduction of Myxoviruses. Comprehensive Virology: 4 Reproduction: Large RNA Viruses. H. Fraenkel-Conrat and R. R. Wagner. Boston, MA, Springer US: 179-252.

Crescenzo-Chaigne, B., C. Barbezange, V. Frigard, D. Poulain and S. van der Werf (2014). "Chimeric NP non coding regions between type A and C influenza viruses reveal their role in translation regulation." PLoS One **9**(9): e109046.

Crescenzo-Chaigne, B., C. Barbezange and S. van der Werf (2008). "Non coding extremities of the seven influenza virus type C vRNA segments: effect on transcription and replication by the type C and type A polymerase complexes." Virol J **5**: 132.

Cros, J. F., A. Garcia-Sastre and P. Palese (2005). "An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein." Traffic **6**(3): 205-213.

Chen, F., J. Zhou, F. Luo, A. B. Mohammed and X. L. Zhang (2007). "Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent *Mycobacterium tuberculosis*." Biochem Biophys Res Commun **357**(3): 743-748.

Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink and J. W. Yewdell (2001). "A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death." Nat Med **7**(12): 1306-1312.

Chen, Z., Y. Li and R. M. Krug (1999). "Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery." Embo j **18**(8): 2273-2283.

Cheng, A., S. M. Wong and Y. A. Yuan (2009). "Structural basis for dsRNA recognition by NS1 protein of influenza A virus." Cell Res **19**(2): 187-195.

D

de la Luna, S., P. Fortes, A. Beloso and J. Ortin (1995). "Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs." J Virol **69**(4): 2427-2433.

de la Luna, S., J. Martin, A. Portela and J. Ortin (1993). "Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from simian virus 40 recombinant viruses." J Gen Virol **74** (Pt 3): 535-539.

de Lucas, S., J. Peredo, R. M. Marion, C. Sanchez and J. Ortin (2010). "Human Staufen1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required for efficient virus multiplication." J Virol **84**(15): 7603-7612.

Deng, T., F. T. Vreede and G. G. Brownlee (2006). "Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication." J Virol **80**(5): 2337-2348.

Desselberger, U., V. R. Racaniello, J. J. Zazra and P. Palese (1980). "The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity." Gene **8**(3): 315-328.

Detjen, B. M., C. St Angelo, M. G. Katze and R. M. Krug (1987). "The three influenza virus polymerase (P) proteins not associated with viral nucleocapsids in the infected cell are in the form of a complex." J Virol **61**(1): 16-22.

- Dias, A., D. Bouvier, T. Crepin, A. A. McCarthy, D. J. Hart, F. Baudin, S. Cusack and R. W. Ruigrok (2009). "The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit." Nature **458**(7240): 914-918.
- Digard, P., V. C. Blok and S. C. Inglis (1989). "Complex formation between influenza virus polymerase proteins expressed in *Xenopus* oocytes." Virology **171**(1): 162-169.
- Doan, L., B. Handa, N. A. Roberts and K. Klumpp (1999). "Metal ion catalysis of RNA cleavage by the influenza virus endonuclease." Biochemistry **38**(17): 5612-5619.
- E**
- Elton, D., M. Simpson-Holley, K. Archer, L. Medcalf, R. Hallam, J. McCauley and P. Digard (2001). "Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway." J Virol **75**(1): 408-419.
- Enami, K., T. A. Sato, S. Nakada and M. Enami (1994). "Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein." J Virol **68**(3): 1432-1437.
- Enami, M. and K. Enami (1996). "Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein." J Virol **70**(10): 6653-6657.
- Enami, M., R. Fukuda and A. Ishihama (1985). "Transcription and replication of eight RNA segments of influenza virus." Virology **142**(1): 68-77.
- Engelhardt, O. G., M. Smith and E. Fodor (2005). "Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II." J Virol **79**(9): 5812-5818.
- F**
- Falcon, A. M., P. Fortes, R. M. Marion, A. Beloso and J. Ortin (1999). "Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro." Nucleic Acids Res **27**(11): 2241-2247.
- Falcon, A. M., R. M. Marion, T. Zurcher, P. Gomez, A. Portela, A. Nieto and J. Ortin (2004). "Defective RNA replication and late gene expression in temperature-sensitive influenza viruses expressing deleted forms of the NS1 protein." J Virol **78**(8): 3880-3888.
- Fattal, E., C. Dubernet and P. Couvreur (2001). "Liposome-based formulations for the delivery of oligonucleotides " STP PHARMA SCIENCES **11**(1): 31-44.
- Flick, R. and G. Hobom (1999). "Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation." J Gen Virol **80** (Pt 10): 2565-2572.
- Flick, R., G. Neumann, E. Hoffmann, E. Neumeier and G. Hobom (1996). "Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure." Rna **2**(10): 1046-1057.
- Fodor, E., M. Crow, L. J. Mingay, T. Deng, J. Sharps, P. Fechter and G. G. Brownlee (2002). "A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs." J Virol **76**(18): 8989-9001.
- Fodor, E., D. C. Pritlove and G. G. Brownlee (1994). "The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription." J Virol **68**(6): 4092-4096.
- Fodor, E., D. C. Pritlove and G. G. Brownlee (1995). "Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus." J Virol **69**(7): 4012-4019.
- Fortes, P., A. Beloso and J. Ortin (1994). "Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport." Embo j **13**(3): 704-712.
- Fortes, P., A. I. Lamond and J. Ortin (1995). "Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components." J Gen Virol **76** (Pt 4): 1001-1007.
- Fujii, K., Y. Fujii, T. Noda, Y. Muramoto, T. Watanabe, A. Takada, H. Goto, T. Horimoto and Y. Kawaoka (2005). "Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions." J Virol **79**(6): 3766-3774.
- Fujii, Y., H. Goto, T. Watanabe, T. Yoshida and Y. Kawaoka (2003). "Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 2002-2007.
- Furuse, Y. and H. Oshitani (2011). "Evolution of the influenza A virus untranslated regions." Infect Genet Evol **11**(5): 1150-1154.
- Furuta, Y., B. B. Gowen, K. Takahashi, K. Shiraki, D. F. Smee and D. L. Barnard (2013). "Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor." Antiviral Res **100**(2): 446-454.
- Furuta, Y., K. Takahashi, M. Kuno-Maekawa, H. Sangawa, S. Uehara, K. Kozaki, N. Nomura, H. Egawa and K. Shiraki (2005). "Mechanism of action of T-705 against influenza virus." Antimicrob

G

Gallie, D. R. (1991). "The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency." Genes Dev **5**(11): 2108-2116.

Garaigorta, U., A. M. Falcon and J. Ortin (2005). "Genetic analysis of influenza virus NS1 gene: a temperature-sensitive mutant shows defective formation of virus particles." J Virol **79**(24): 15246-15257.

Garaigorta, U. and J. Ortin (2007). "Mutation analysis of a recombinant NS replicon shows that influenza virus NS1 protein blocks the splicing and nucleo-cytoplasmic transport of its own viral mRNA." Nucleic Acids Res **35**(14): 4573-4582.

Garfinkel, M. S. and M. G. Katze (1992). "Translational control by influenza virus. Selective and cap-dependent translation of viral mRNAs in infected cells." J Biol Chem **267**(13): 9383-9390.

Garfinkel, M. S. and M. G. Katze (1993). "Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region." J Biol Chem **268**(30): 22223-22226.

Gastaminza, P., B. Perales, A. M. Falcon and J. Ortin (2003). "Mutations in the N-terminal region of influenza virus PB2 protein affect virus RNA replication but not transcription." J Virol **77**(9): 5098-5108.

Giard, D. J., S. A. Aaronson, G. J. Todaro, P. Arnstein, J. H. Kersey, H. Dosik and W. P. Parks (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1417-1423.

Gibbs, J. S., D. Malide, F. Hornung, J. R. Bennink and J. W. Yewdell (2003). "The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function." J Virol **77**(13): 7214-7224.

Gingras, A. C., B. Raught and N. Sonenberg (1999). "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." Annu Rev Biochem **68**: 913-963.

Gomez-Puertas, P., C. Albo, E. Perez-Pastrana, A. Vivo and A. Portela (2000). "Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding." J Virol **74**(24): 11538-11547.

Gomez-Puertas, P., I. Mena, M. Castillo, A. Vivo,

E. Perez-Pastrana and A. Portela (1999). "Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on the expression levels of viral proteins." J Gen Virol **80** (Pt 7): 1635-1645.

Goto, H., Y. Muramoto, T. Noda and Y. Kawaoka (2013). "The genome-packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome-bundling signal." J Virol **87**(21): 11316-11322.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.

Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." Virology **52**(2): 456-467.

Grate, D. and C. Wilson (2001). "Inducible regulation of the *S. cerevisiae* cell cycle mediated by an RNA aptamer-ligand complex." Bioorg Med Chem **9**(10): 2565-2570.

Gray, N. K., J. M. Collier, K. S. Dickson and M. Wickens (2000). "Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo." Embo j **19**(17): 4723-4733.

Green, R., A. D. Ellington and J. W. Szostak (1990). "In vitro genetic analysis of the Tetrahymena self-splicing intron." Nature **347**(6291): 406-408.

Greenspan, D., P. Palese and M. Krystal (1988). "Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein." J Virol **62**(8): 3020-3026.

Gu, W., G. R. Gallagher, W. Dai, P. Liu, R. Li, M. I. Trombly, D. B. Gammon, C. C. Mello, J. P. Wang and R. W. Finberg (2015). "Influenza A virus preferentially snatches noncoding RNA caps." Rna **21**(12): 2067-2075.

Guerra-Perez, N., E. Ramos, M. Garcia-Hernandez, C. Pinto, M. Soto, M. E. Martin and V. M. Gonzalez (2015). "Molecular and Functional Characterization of ssDNA Aptamers that Specifically Bind *Leishmania infantum* PABP." PLoS One **10**(10): e0140048.

Guerra, N., M. Vega-Sendino, M. I. Perez-Morgado, E. Ramos, M. Soto, V. M. Gonzalez and M. E. Martin (2011). "Identification and functional characterization of a poly(A)-binding protein from *Leishmania infantum* (LiPABP)." FEBS Lett **585**(1): 193-198.

Guo, Z., L. M. Chen, H. Zeng, J. A. Gomez, J. Plowden, T. Fujita, J. M. Katz, R. O. Donis and S. Sambhara (2007). "NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen

sensor, RIG-I." *Am J Respir Cell Mol Biol* **36**(3): 263-269.

H

Hagen, M., T. D. Chung, J. A. Butcher and M. Krystal (1994). "Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity." *J Virol* **68**(3): 1509-1515.

Hale, B. G., R. E. Randall, J. Ortin and D. Jackson (2008). "The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses." *J Gen Virol* **89**(Pt 10): 2359-2376.

Hara, K., M. Shiota, H. Kido, Y. Ohtsu, T. Kashiwagi, J. Iwahashi, N. Hamada, K. Mizoue, N. Tsumura, H. Kato and T. Toyoda (2001). "Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site." *Genes Cells* **6**(2): 87-97.

Hatada, E. and R. Fukuda (1992). "Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro." *J Gen Virol* **73** (Pt 12): 3325-3329.

Hatada, E., S. Saito and R. Fukuda (1999). "Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells." *J Virol* **73**(3): 2425-2433.

Hatada, E., S. Saito, N. Okishio and R. Fukuda (1997). "Binding of the influenza virus NS1 protein to model genome RNAs." *J Gen Virol* **78** (Pt 5): 1059-1063.

Hatada, E., T. Takizawa and R. Fukuda (1992). "Specific binding of influenza A virus NS1 protein to the virus minus-sense RNA in vitro." *J Gen Virol* **73** (Pt 1): 17-25.

Hatta, M., P. Gao, P. Halfmann and Y. Kawaoka (2001). "Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses." *Science* **293**(5536): 1840-1842.

Hay, A. J., J. J. Skehel and J. McCauley (1982). "Characterization of influenza virus RNA complete transcripts." *Virology* **116**(2): 517-522.

Helenius, A. (1992). "Unpacking the incoming influenza virus." *Cell* **69**(4): 577-578.

Hemerka, J. N., D. Wang, Y. Weng, W. Lu, R. S. Kaushik, J. Jin, A. F. Harmon and F. Li (2009). "Detection and characterization of influenza A virus PA-PB2 interaction through a bimolecular fluorescence complementation assay." *J Virol* **83**(8): 3944-3955.

Hermann, T. and D. J. Patel (2000). "Adaptive recognition by nucleic acid aptamers." *Science* **287**(5454): 820-825.

Hofmann, H. P., S. Limmer, V. Hornung and M. Sprinzl (1997). "Ni²⁺-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair." *Rna* **3**(11): 1289-1300.

Honda, A. (2008). "Role of host protein Ebp1 in influenza virus growth: intracellular localization of Ebp1 in virus-infected and uninfected cells." *J Biotechnol* **133**(2): 208-212.

Honda, A., J. Mukaigawa, A. Yokoiyama, A. Kato, S. Ueda, K. Nagata, M. Krystal, D. P. Nayak and A. Ishihama (1990). "Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8." *J Biochem* **107**(4): 624-628.

Honda, A., K. Ueda, K. Nagata and A. Ishihama (1988). "RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation." *J Biochem* **104**(6): 1021-1026.

Horne, R. W., A. P. Waterson, P. Wildy and A. E. Farnham (1960). "The structure and composition of the myxoviruses. I. Electron microscope studies of the structure of myxovirus particles by negative staining techniques." *Virology* **11**: 79-98.

Hoyle, L., R. W. Horne and A. P. Waterson (1961). "The structure and composition of the myxoviruses. II. Components released from the influenza virus particle by ether." *Virology* **13**: 448-459.

Hsu, M. T., J. D. Parvin, S. Gupta, M. Krystal and P. Palese (1987). "Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(22): 8140-8144.

Hughey, P. G., P. C. Roberts, L. J. Holsinger, S. L. Zebedee, R. A. Lamb and R. W. Compans (1995). "Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly." *Virology* **212**(2): 411-421.

Hurt, A. C., D. S. Hui, A. Hay and F. G. Hayden (2015). "Overview of the 3rd isirv-Antiviral Group Conference--advances in clinical management." *Influenza Other Respir Viruses* **9**(1): 20-31.

Hwang, S. Y., H. Y. Sun, K. H. Lee, B. H. Oh, Y. J. Cha, B. H. Kim and J. Y. Yoo (2012). "5'-Triphosphate-RNA-independent activation of RIG-I via RNA aptamer with enhanced antiviral activity." *Nucleic Acids Res* **40**(6): 2724-2733.

Imataka, H., A. Gradi and N. Sonenberg (1998). "A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation." *Embo j* **17**(24): 7480-7489.

Inglis, S. C., A. R. Carroll, R. A. Lamb and B. W. Mahy (1976). "Polypeptides specified by the influenza virus genome I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus." *Virology* **74**(2): 489-503.

Inglis, S. C. and B. W. Mahy (1979). "Polypeptides specified by the influenza virus genome. 3. Control of synthesis in infected cells." *Virology* **95**(1): 154-164.

Itoh, Y., K. Shinya, M. Kiso, T. Watanabe, Y. Sakoda, M. Hatta, Y. Muramoto, D. Tamura, Y. Sakai-Tagawa, T. Noda, S. Sakabe, M. Imai, Y. Hatta, S. Watanabe, C. Li, S. Yamada, K. Fujii, S. Murakami, H. Imai, S. Kakugawa, M. Ito, R. Takano, K. Iwatsuki-Horimoto, M. Shimojima, T. Horimoto, H. Goto, K. Takahashi, A. Makino, H. Ishigaki, M. Nakayama, M. Okamatsu, K. Takahashi, D. Warshauer, P. A. Shult, R. Saito, H. Suzuki, Y. Furuta, M. Yamashita, K. Mitamura, K. Nakano, M. Nakamura, R. Brockman-Schneider, H. Mitamura, M. Yamazaki, N. Sugaya, M. Suresh, M. Ozawa, G. Neumann, J. Gern, H. Kida, K. Ogasawara and Y. Kawaoka (2009). "In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses." *Nature* **460**(7258): 1021-1025.

Iwatsuki-Horimoto, K., T. Horimoto, T. Noda, M. Kiso, J. Maeda, S. Watanabe, Y. Muramoto, K. Fujii and Y. Kawaoka (2006). "The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly." *J Virol* **80**(11): 5233-5240.

J

Jagger, B. W., H. M. Wise, J. C. Kash, K. A. Walters, N. M. Wills, Y. L. Xiao, R. L. Dunfee, L. M. Schwartzman, A. Ozinsky, G. L. Bell, R. M. Dalton, A. Lo, S. Efstathiou, J. F. Atkins, A. E. Firth, J. K. Taubenberger and P. Digard (2012). "An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response." *Science* **337**(6091): 199-204.

Jenison, R. D., S. C. Gill, A. Pardi and B. Polisky (1994). "High-resolution molecular discrimination by RNA." *Science* **263**(5152): 1425-1429.

Jeon, S. H., B. Kayhan, T. Ben-Yedidia and R. Arnon (2004). "A DNA aptamer prevents influenza infection by blocking the receptor binding region of the viral hemagglutinin." *J Biol Chem* **279**(46): 48410-48419.

Jorba, N., R. Coloma and J. Ortin (2009). "Genetic trans-complementation establishes a new model for influenza virus RNA transcription and replication." *PLoS Pathog* **5**(5): e1000462.

Jorba, N., S. Juarez, E. Torreira, P. Gastaminza, N. Zamarreno, J. P. Albar and J. Ortin (2008). "Analysis of the interaction of influenza virus polymerase

complex with human cell factors." *Proteomics* **8**(10): 2077-2088.

K

Kanwar, J. R., K. Roy and R. K. Kanwar (2011). "Chimeric aptamers in cancer cell-targeted drug delivery." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **46**(6): 459-477.

Kato, A., K. Mizumoto and A. Ishihama (1985). "Purification and enzymatic properties of an RNA polymerase-RNA complex from influenza virus." *Virus Res* **3**(2): 115-127.

Katze, M. G. and R. M. Krug (1990). "Translational control in influenza virus-infected cells." *Enzyme* **44**(1-4): 265-277.

Katze, M. G., J. Lara and M. Wambach (1989). "Nontranslated cellular mRNAs are associated with the cytoskeletal framework in influenza virus or adenovirus infected cells." *Virology* **169**(2): 312-322.

Kawakami, E., T. Watanabe, K. Fujii, H. Goto, S. Watanabe, T. Noda and Y. Kawaoka (2011). "Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA." *J Virol Methods* **173**(1): 1-6.

Kim, H. J., E. Fodor, G. G. Brownlee and B. L. Seong (1997). "Mutational analysis of the RNA-fork model of the influenza A virus vRNA promoter in vivo." *J Gen Virol* **78** (Pt 2): 353-357.

Klumpp, K., M. J. Ford and R. W. Ruigrok (1998). "Variation in ATP requirement during influenza virus transcription." *J Gen Virol* **79** (Pt 5): 1033-1045.

Klumpp, K., R. W. Ruigrok and F. Baudin (1997). "Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure." *Embo j* **16**(6): 1248-1257.

Kobayashi, M., T. Toyoda and A. Ishihama (1996). "Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase." *Arch Virol* **141**(3-4): 525-539.

Krug, R. M., B. A. Broni and M. Bouloy (1979). "Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs?" *Cell* **18**(2): 329-334.

Krug, R. M. and P. R. Etkind (1973). "Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells." *Virology* **56**(1): 334-348.

Krug, R. M., C. St Angelo, B. Broni and G. Shapiro (1987). "Transcription and replication of influenza virion RNA in the nucleus of infected cells." *Cold*

Kwon, D., K. Shin, S. Kim, Y. Ha, J. H. Choi, J. S. Yang, J. Y. Lee, C. Chae, H. B. Oh and C. Kang (2010). "Replication and pathogenesis of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in mammalian models." J Microbiol **48**(5): 657-662.

L

Lamb, R. A. and P. W. Choppin (1976). "Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription." Virology **74**(2): 504-519.

Lamb, R. A. and P. W. Choppin (1979). "Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 4908-4912.

Lamb, R. A., P. W. Choppin, R. M. Chanock and C. J. Lai (1980). "Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(4): 1857-1861.

Lamb, R. A. and C. M. Horvath (1991). "Diversity of coding strategies in influenza viruses." Trends Genet **7**(8): 261-266.

Lamb, R. A. and C. J. Lai (1982). "Spliced and unspliced messenger RNAs synthesized from cloned influenza virus M DNA in an SV40 vector: expression of the influenza virus membrane protein (M1)." Virology **123**(2): 237-256.

Lamb, R. A. and C. J. Lai (1984). "Expression of unspliced NS1 mRNA, spliced NS2 mRNA, and a spliced chimera mRNA from cloned influenza virus NS DNA in an SV40 vector." Virology **135**(1): 139-147.

Lamb, R. A., C. J. Lai and P. W. Choppin (1981). "Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(7): 4170-4174.

Landeras-Bueno, S., N. Jorba, M. Perez-Cidoncha and J. Ortin (2011). "The splicing factor proline-glutamine rich (SFPQ/PSF) is involved in influenza virus transcription." PLoS Pathog **7**(11): e1002397.

Leahy, M. B., H. C. Dobbyn and G. G. Brownlee (2001). "Hairpin loop structure in the 3' arm of the influenza A virus virion RNA promoter is required for endonuclease activity." J Virol **75**(15): 7042-7049.

Leahy, M. B., D. C. Pritlove, L. L. Poon and G. G. Brownlee (2001). "Mutagenic analysis of

the 5' arm of the influenza A virus virion RNA promoter defines the sequence requirements for endonuclease activity." J Virol **75**(1): 134-142.

Lee, M. K., S. H. Bae, C. J. Park, H. K. Cheong, C. Cheong and B. S. Choi (2003). "A single-nucleotide natural variation (U4 to C4) in an influenza A virus promoter exhibits a large structural change: implications for differential viral RNA synthesis by RNA-dependent RNA polymerase." Nucleic Acids Res **31**(4): 1216-1223.

Li, W., X. Feng, X. Yan, K. Liu and L. Deng (2016). "A DNA Aptamer Against Influenza A Virus: An Effective Inhibitor to the Hemagglutinin-Glycan Interactions." Nucleic Acid Ther.

Li, W. X., H. Li, R. Lu, F. Li, M. Dus, P. Atkinson, E. W. Brydon, K. L. Johnson, A. Garcia-Sastre, L. A. Ball, P. Palese and S. W. Ding (2004). "Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(5): 1350-1355.

Li, X. and P. Palese (1994). "Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA." J Virol **68**(2): 1245-1249.

Li, Y., Y. Yamakita and R. M. Krug (1998). "Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 4864-4869.

Liang, Y., Y. Hong and T. G. Parslow (2005). "cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments." J Virol **79**(16): 10348-10355.

Liang, Y., T. Huang, H. Ly, T. G. Parslow and Y. Liang (2008). "Mutational analyses of packaging signals in influenza virus PA, PB1, and PB2 genomic RNA segments." J Virol **82**(1): 229-236.

Ling, J., S. J. Morley and J. A. Traugh (2005). "Inhibition of cap-dependent translation via phosphorylation of eIF4G by protein kinase Pak2." Embo j **24**(23): 4094-4105.

Liu, C., M. C. Eichelberger, R. W. Compans and G. M. Air (1995). "Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding." J Virol **69**(2): 1099-1106.

Lopez, J. A., M. Guillen, A. Sanchez-Fauquier and J. A. Melero (1986). "An antigen-binding assay to determine the specificity of monoclonal antibodies against influenza virus and mapping of epitopes." J Virol Methods **13**(3): 255-264.

Luo, G. X., W. Luytjes, M. Enami and P. Palese (1991). "The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed

by the RNA duplex of the panhandle structure." J Virol **65**(6): 2861-2867.

Luytjes, W., M. Krystal, M. Enami, J. D. Parvin and P. Palese (1989). "Amplification, expression, and packaging of foreign gene by influenza virus." Cell **59**(6): 1107-1113.

LL

Llompарт, C. M., A. Nieto and A. Rodriguez-Frandsen (2014). "Specific residues of PB2 and PA influenza virus polymerase subunits confer the ability for RNA polymerase II degradation and virus pathogenicity in mice." J Virol **88**(6): 3455-3463.

M

Ma, J., K. Liu, C. Xue, J. Zhou, S. Xu, Y. Ren, J. Zheng and Y. Cao (2013). "Impact of the segment-specific region of the 3'-untranslated region of the influenza A virus PB1 segment on protein expression." Virus Genes **47**(3): 429-438.

Madin, S. H. and N. B. Darby, Jr. (1958). "Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin." Proc Soc Exp Biol Med **98**(3): 574-576.

Mahy, B. W. J. (1983). Springer.

Mahy, B. W. J. (1983). Mutants of influenza virus. In Genetics of influenza viruses, Springer.

Mallikaratchy, P., Z. Tang, S. Kwame, L. Meng, D. Shangguan and W. Tan (2007). "Aptamer directly evolved from live cells recognizes membrane bound immunoglobulin heavy mu chain in Burkitt's lymphoma cells." Mol Cell Proteomics **6**(12): 2230-2238.

Marion, R. M., T. Aragon, A. Beloso, A. Nieto and J. Ortin (1997). "The N-terminal half of the influenza virus NS1 protein is sufficient for nuclear retention of mRNA and enhancement of viral mRNA translation." Nucleic Acids Res **25**(21): 4271-4277.

Marion, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti and J. Ortin (1999). "A human sequence homologue of Staufien is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum." Mol Cell Biol **19**(3): 2212-2219.

Martin-Benito, J., E. Area, J. Ortega, O. Llorca, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa and J. Ortin (2001). "Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle." EMBO Rep **2**(4): 313-317.

Martin, K. and A. Helenius (1991). "Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import." Cell **67**(1): 117-130.

Masud, M. M., M. Kuwahara, H. Ozaki and H. Sawai (2004). "Sialyllactose-binding modified DNA aptamer bearing additional functionality by SELEX." Bioorg Med Chem **12**(5): 1111-1120.

Matlin, K. S., H. Reggio, A. Helenius and K. Simons (1981). "Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line." J Cell Biol **91**(3 Pt 1): 601-613.

Matlin, K. S., H. Reggio, A. Helenius and K. Simons (1982). "The entry of enveloped viruses into an epithelial cell line." Prog Clin Biol Res **91**: 599-611.

Mayer, D., K. Molawi, L. Martinez-Sobrido, A. Ghanem, S. Thomas, S. Baginsky, J. Grossmann, A. Garcia-Sastre and M. Schwemmle (2007). "Identification of cellular interaction partners of the influenza virus ribonucleoprotein complex and polymerase complex using proteomic-based approaches." J Proteome Res **6**(2): 672-682.

Mazur, I., D. Anhlán, D. Mitzner, L. Wixler, U. Schubert and S. Ludwig (2008). "The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein." Cell Microbiol **10**(5): 1140-1152.

McCown, M. F. and A. Pekosz (2006). "Distinct domains of the influenza A virus M2 protein cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus production." J Virol **80**(16): 8178-8189.

McKimm-Breschkin, J. L. (2013). "Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance." Influenza Other Respir Viruses **7 Suppl 1**: 25-36.

Medcalf, L., E. Poole, D. Elton and P. Digard (1999). "Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein." J Virol **73**(9): 7349-7356.

Meijer, A., A. Lackenby, O. Hungnes, B. Lina, S. van-der-Werf, B. Schweiger, M. Opp, J. Paget, J. van-de-Kasstele, A. Hay and M. Zambon (2009). "Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season." Emerg Infect Dis **15**(4): 552-560.

Mena, I., A. Vivo, E. Perez and A. Portela (1996). "Rescue of a synthetic chloramphenicol acetyltransferase RNA into influenza virus-like particles obtained from recombinant plasmids." J Virol **70**(8): 5016-5024.

Merrick, W. C. and J. W. B. Hershey (1996). The pathway and mechanism of protein synthesis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NewYork.

- Mibayashi, M., L. Martinez-Sobrido, Y. M. Loo, W. B. Cardenas, M. Gale, Jr. and A. Garcia-Sastre (2007). "Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus." *J Virol* **81**(2): 514-524.
- Min, J. Y. and R. M. Krug (2006). "The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(18): 7100-7105.
- Moss, R. B., C. Hansen, R. L. Sanders, S. Hawley, T. Li and R. T. Steigbigel (2012). "A phase II study of DAS181, a novel host directed antiviral for the treatment of influenza infection." *J Infect Dis* **206**(12): 1844-1851.
- Muramoto, Y., T. Noda, E. Kawakami, R. Akkina and Y. Kawaoka (2013). "Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA." *J Virol* **87**(5): 2455-2462.
- Muramoto, Y., T. Noda and Y. Kawaoka (2006). "[Selective packaging mechanism for influenza A virus]." *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **51**(11): 1596-1601.
- Muramoto, Y., A. Takada, K. Fujii, T. Noda, K. Iwatsuki-Horimoto, S. Watanabe, T. Horimoto, H. Kida and Y. Kawaoka (2006). "Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions." *J Virol* **80**(5): 2318-2325.
- Musafia, B., R. Oren-Banaroya and S. Noiman (2014). "Designing anti-influenza aptamers: novel quantitative structure activity relationship approach gives insights into aptamer-virus interaction." *PLoS One* **9**(5): e97696.
- Nagata, K., A. Kawaguchi and T. Naito (2008). "Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome." *Rev Med Virol* **18**(4): 247-260.
- Nayak, D. P., R. A. Balogun, H. Yamada, Z. H. Zhou and S. Barman (2009). "Influenza virus morphogenesis and budding." *Virus Res* **143**(2): 147-161.
- Nayak, D. P., E. K. Hui and S. Barman (2004). "Assembly and budding of influenza virus." *Virus Res* **106**(2): 147-165.
- Neuman-Silberberg, F. S. and T. Schupbach (1994). "Dorsoventral axis formation in *Drosophila* depends on the correct dosage of the gene *gurken*." *Development* **120**(9): 2457-2463.
- Neumann, G., M. T. Hughes and Y. Kawaoka (2000). "Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1." *Embo j* **19**(24): 6751-6758.
- Neumann, G., T. Noda and Y. Kawaoka (2009). "Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus." *Nature* **459**(7249): 931-939.
- Neumann, G., T. Watanabe, H. Ito, S. Watanabe, H. Goto, P. Gao, M. Hughes, D. R. Perez, R. Donis, E. Hoffmann, G. Hobom and Y. Kawaoka (1999). "Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16): 9345-9350.
- Ng, S. S., O. T. Li, T. K. Cheung, J. S. Malik Peiris and L. L. Poon (2008). "Heterologous influenza vRNA segments with identical non-coding sequences stimulate viral RNA replication in trans." *Virol J* **5**: 2.
- Noda, T., H. Sagara, A. Yen, A. Takada, H. Kida, R. H. Cheng and Y. Kawaoka (2006). "Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles." *Nature* **439**(7075): 490-492.
- Noton, S. L., E. Medcalf, D. Fisher, A. E. Mullin, D. Elton and P. Digard (2007). "Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions." *J Gen Virol* **88**(Pt 8): 2280-2290.
- O'Neill, R. E., R. Jaskunas, G. Blobel, P. Palese and J. Moroianu (1995). "Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import." *J Biol Chem* **270**(39): 22701-22704.
- O'Neill, R. E., J. Talon and P. Palese (1998). "The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins." *Embo j* **17**(1): 288-296.
- Ochoa, M., J. Barcena, S. de la Luna, J. A. Melero, A. R. Douglas, A. Nieto, J. Ortin, J. J. Skehel and A. Portela (1995). "Epitope mapping of cross-reactive monoclonal antibodies specific for the influenza A virus PA and PB2 polypeptides." *Virus Res* **37**(3): 305-315.
- Ortega, J., J. Martin-Benito, T. Zurcher, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa and J. Ortin (2000). "Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification." *J Virol* **74**(1): 156-163.

Ozawa, M., J. Maeda, K. Iwatsuki-Horimoto, S. Watanabe, H. Goto, T. Horimoto and Y. Kawaoka (2009). "Nucleotide sequence requirements at the 5' end of the influenza A virus M RNA segment for efficient virus replication." *J Virol* **83**(7): 3384-3388.

P

Pain, V. M. (1996). "Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells." *Eur J Biochem* **236**(3): 747-771.

Palese, P. and R. W. Compans (1976). "Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action." *J Gen Virol* **33**(1): 159-163.

Palese, P. and J. Schulman (1974). "Isolation and characterization of influenza virus recombinants with high and low neuraminidase activity. Use of 2-(3'-methoxyphenyl)-n-acetylneuraminic acid to identify cloned populations." *Virology* **57**(1): 227-237.

Park, Y. W. and M. G. Katze (1995). "Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation." *J Biol Chem* **270**(47): 28433-28439.

Park, Y. W., J. Wilusz and M. G. Katze (1999). "Regulation of eukaryotic protein synthesis: selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6694-6699.

Pe'ery, T. and M. B. Mathews (2000). *Viral translational strategies and host defense mechanisms*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Perales, B. and J. Ortin (1997). "The influenza A virus PB2 polymerase subunit is required for the replication of viral RNA." *J Virol* **71**(2): 1381-1385.

Pflug, A., D. Guilligay, S. Reich and S. Cusack (2014). "Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter." *Nature* **516**(7531): 355-360.

Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, T. I. Naslund, P. Liljestrom, F. Weber and C. Reis e Sousa (2006). "RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates." *Science* **314**(5801): 997-1001.

Pinto, L. H., L. J. Holsinger and R. A. Lamb (1992). "Influenza virus M2 protein has ion channel activity." *Cell* **69**(3): 517-528.

Pinto, L. H. and R. A. Lamb (2007). "Controlling

influenza virus replication by inhibiting its proton channel." *Mol Biosyst* **3**(1): 18-23.

Pleschka, S., T. Wolff, C. Ehrhardt, G. Hobom, O. Planz, U. R. Rapp and S. Ludwig (2001). "Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade." *Nat Cell Biol* **3**(3): 301-305.

Plotch, S. J., M. Bouloy, I. Ulmanen and R. M. Krug (1981). "A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription." *Cell* **23**(3): 847-858.

Poole, E., D. Elton, L. Medcalf and P. Digard (2004). "Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites." *Virology* **321**(1): 120-133.

Poon, L. L., D. C. Pritlove, E. Fodor and G. G. Brownlee (1999). "Direct evidence that the poly(A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template." *J Virol* **73**(4): 3473-3476.

Poon, L. L., D. C. Pritlove, J. Sharps and G. G. Brownlee (1998). "The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA." *J Virol* **72**(10): 8214-8219.

Portela, A., T. Zurcher, A. Nieto and J. Ortin (1999). "Replication of orthomyxoviruses." *Adv Virus Res* **54**: 319-348.

Pritlove, D. C., L. L. Poon, L. J. Devenish, M. B. Leahy and G. G. Brownlee (1999). "A hairpin loop at the 5' end of influenza A virus virion RNA is required for synthesis of poly(A)+ mRNA in vitro." *J Virol* **73**(3): 2109-2114.

Pritlove, D. C., L. L. Poon, E. Fodor, J. Sharps and G. G. Brownlee (1998). "Polyadenylation of influenza virus mRNA transcribed in vitro from model virion RNA templates: requirement for 5' conserved sequences." *J Virol* **72**(2): 1280-1286.

Q

Qiu, Y., M. Nemeroff and R. M. Krug (1995). "The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing." *Rna* **1**(3): 304-316.

R

Reich, S., D. Guilligay, A. Pflug, H. Malet, I. Berger, T. Crepin, D. Hart, T. Lunardi, M. Nanao, R. W. Ruigrok and S. Cusack (2014). "Structural insight into cap-snatching and RNA synthesis by influenza polymerase." *Nature* **516**(7531): 361-366.

- Resa-Infante, P., N. Jorba, R. Coloma and J. Ortin (2011). "The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function." *RNA Biol* **8**(2): 207-215.
- Resa-Infante, P., N. Jorba, N. Zamarreno, Y. Fernandez, S. Juarez and J. Ortin (2008). "The host-dependent interaction of alpha-importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication." *PLoS One* **3**(12): e3904.
- Rhie, A., L. Kirby, N. Sayer, R. Wellesley, P. Disterer, I. Sylvester, A. Gill, J. Hope, W. James and A. Tahiri-Alaoui (2003). "Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion." *J Biol Chem* **278**(41): 39697-39705.
- Richardson, J. C. and R. K. Akkina (1991). "NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells." *Arch Virol* **116**(1-4): 69-80.
- Richter, J. D. and N. Sonenberg (2005). "Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins." *Nature* **433**(7025): 477-480.
- Robb, N. C. and E. Fodor (2012). "The accumulation of influenza A virus segment 7 spliced mRNAs is regulated by the NS1 protein." *J Gen Virol* **93**(Pt 1): 113-118.
- Robb, N. C., D. Jackson, F. T. Vreede and E. Fodor (2010). "Splicing of influenza A virus NS1 mRNA is independent of the viral NS1 protein." *J Gen Virol* **91**(Pt 9): 2331-2340.
- Robb, N. C., M. Smith, F. T. Vreede and E. Fodor (2009). "NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome." *J Gen Virol* **90**(Pt 6): 1398-1407.
- Roberts, P. C., R. A. Lamb and R. W. Compans (1998). "The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation." *Virology* **240**(1): 127-137.
- Robertson, D. L. and G. F. Joyce (1990). "Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA." *Nature* **344**(6265): 467-468.
- Robertson, J. S. (1979). "5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus." *Nucleic Acids Res* **6**(12): 3745-3757.
- Rodriguez, A., A. Perez-Gonzalez, M. J. Hossain, L. M. Chen, T. Rolling, P. Perez-Brena, R. Donis, G. Kochs and A. Nieto (2009). "Attenuated strains of influenza A viruses do not induce degradation of RNA polymerase II." *J Virol* **83**(21): 11166-11174.
- Rodriguez, A., A. Perez-Gonzalez and A. Nieto (2007). "Influenza virus infection causes specific degradation of the largest subunit of cellular RNA polymerase II." *J Virol* **81**(10): 5315-5324.
- Rodriguez, A., A. Perez-Gonzalez and A. Nieto (2011). "Cellular human CLE/C14orf166 protein interacts with influenza virus polymerase and is required for viral replication." *J Virol* **85**(22): 12062-12066.
- Sansom, M. S., I. D. Kerr, G. R. Smith and H. S. Son (1997). "The influenza A virus M2 channel: a molecular modeling and simulation study." *Virology* **233**(1): 163-173.
- Sanz-Ezquerro, J. J., S. de la Luna, J. Ortin and A. Nieto (1995). "Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins." *J Virol* **69**(4): 2420-2426.
- Sanz-Ezquerro, J. J., J. Fernandez Santaren, T. Sierra, T. Aragon, J. Ortega, J. Ortin, G. L. Smith and A. Nieto (1998). "The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein." *J Gen Virol* **79** (Pt 3): 471-478.
- Sanz-Ezquerro, J. J., T. Zurcher, S. de la Luna, J. Ortin and A. Nieto (1996). "The amino-terminal one-third of the influenza virus PA protein is responsible for the induction of proteolysis." *J Virol* **70**(3): 1905-1911.
- Sazani, P. L., R. Larralde and J. W. Szostak (2004). "A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP." *J Am Chem Soc* **126**(27): 8370-8371.
- Scheiffele, P., A. Rietveld, T. Wilk and K. Simons (1999). "Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane." *J Biol Chem* **274**(4): 2038-2044.
- Schickli, J. H., A. Flandorfer, T. Nakaya, L. Martinez-Sobrido, A. Garcia-Sastre and P. Palese (2001). "Plasmid-only rescue of influenza A virus vaccine candidates." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**(1416): 1965-1973.
- Schroeder, C., H. Heider, E. Moncke-Buchner and T. I. Lin (2005). "The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein." *Eur Biophys J* **34**(1): 52-66.
- Schulman, J. L. and P. Palese (1977). "Virulence factors of influenza A viruses: WSN virus neuraminidase required for plaque production in MDBK cells." *J Virol* **24**(1): 170-176.
- Sekiya, S., F. Nishikawa, K. Noda, P. K. Kumar, T. Yokoyama and S. Nishikawa (2005). "In vitro

S

selection of RNA aptamers against cellular and abnormal isoform of mouse prion protein." Nucleic Acids Symp Ser (Oxf) **(49)**: 361-362.

Shangguan, D., Y. Li, Z. Tang, Z. C. Cao, H. W. Chen, P. Mallikaratchy, K. Sefah, C. J. Yang and W. Tan (2006). "Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(32): 11838-11843.

Shapiro, G. I., T. Gurney, Jr. and R. M. Krug (1987). "Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs." J Virol **61**(3): 764-773.

Shaw, M. W., E. W. Lamon and R. W. Compans (1982). "Immunologic studies on the influenza A virus nonstructural protein NS1." J Exp Med **156**(1): 243-254.

Shih, S. R., M. E. Nemeroff and R. M. Krug (1995). "The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(14): 6324-6328.

Sieczkarski, S. B. and G. R. Whittaker (2002). "Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis." J Virol **76**(20): 10455-10464.

Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson and D. G. Higgins (2011). "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega." Mol Syst Biol **7**: 539.

Simpson-Holley, M., D. Ellis, D. Fisher, D. Elton, J. McCauley and P. Digard (2002). "A functional link between the actin cytoskeleton and lipid rafts during budding of filamentous influenza virions." Virology **301**(2): 212-225.

Skehel, J. J. (1973). "Early polypeptide synthesis in influenza virus-infected cells." Virology **56**(1): 394-399.

Skehel, J. J., T. Bizebard, P. A. Bullough, F. M. Hughson, M. Knossow, D. A. Steinhauer, S. A. Wharton and D. C. Wiley (1995). "Membrane fusion by influenza hemagglutinin." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **60**: 573-580.

Skehel, J. J. and A. J. Hay (1978). "Nucleotide sequences at the 5' termini of influenza virus RNAs and their transcripts." Nucleic Acids Res **5**(4): 1207-1219.

Smith, W., C. H. Andrewes and P. P. Laidlaw (1933). "A virus obtained from influenza patients." Lancet **i**: 66-68.

Sonenberg, N. and T. E. Dever (2003). "Eukaryotic translation initiation factors and regulators." Curr Opin Struct Biol **13**(1): 56-63.

Stegmann, T., F. P. Booy and J. Wilschut (1987). "Effects of low pH on influenza virus. Activation and inactivation of the membrane fusion capacity of the hemagglutinin." J Biol Chem **262**(36): 17744-17749.

Stegmann, T., H. W. Morselt, F. P. Booy, J. F. van Breemen, G. Scherphof and J. Wilschut (1987). "Functional reconstitution of influenza virus envelopes." Embo j **6**(9): 2651-2659.

Stoeckle, M. Y., M. W. Shaw and P. W. Choppin (1987). "Segment-specific and common nucleotide sequences in the noncoding regions of influenza B virus genome RNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(9): 2703-2707.

Stoltenburg, R., C. Reinemann and B. Strehlitz (2005). "FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection." Anal Bioanal Chem **383**(1): 83-91.

Suzuki, Y. and Y. Kobayashi (2013). "Evolution of complementary nucleotides in 5' and 3' untranslated regions of influenza A virus genomic segments." Infect Genet Evol **13**: 175-179.

T

Takeda, M., A. Pekosz, K. Shuck, L. H. Pinto and R. A. Lamb (2002). "Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture." J Virol **76**(3): 1391-1399.

Tan, S. L. and M. G. Katze (1998). "Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase." J Interferon Cytokine Res **18**(9): 757-766.

Tarun, S. Z., Jr. and A. B. Sachs (1996). "Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G." Embo j **15**(24): 7168-7177.

Tarun, S. Z., Jr., S. E. Wells, J. A. Deardorff and A. B. Sachs (1997). "Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9046-9051.

Tiley, L. S., M. Hagen, J. T. Matthews and M. Krystal (1994). "Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs." J Virol **68**(8): 5108-5116.

Tomescu, A. I., N. C. Robb, N. Hengrung, E. Fodor and A. N. Kapanidis (2014). "Single-molecule

- FRET reveals a corkscrew RNA structure for the polymerase-bound influenza virus promoter." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(32): E3335-3342.
- Tuerk, C. and L. Gold (1990). "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase." Science **249**(4968): 505-510.
- U**
- Ulmanen, I., B. A. Broni and R. M. Krug (1981). "Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7355-7359.
- V**
- Villace, P., R. M. Marion and J. Ortin (2004). "The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs." Nucleic Acids Res **32**(8): 2411-2420.
- W**
- Wakiyama, M., H. Imataka and N. Sonenberg (2000). "Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for *Xenopus* oocyte maturation." Curr Biol **10**(18): 1147-1150.
- Watanabe, T., S. Watanabe, T. Noda, Y. Fujii and Y. Kawaoka (2003). "Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes." J Virol **77**(19): 10575-10583.
- Waterhouse, A. M., J. B. Procter, D. M. Martin, M. Clamp and G. J. Barton (2009). "Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench." Bioinformatics **25**(9): 1189-1191.
- Weber, F. (2015). "The catcher in the RIG-I." Cytokine **76**(1): 38-41.
- Weis, W., J. H. Brown, S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel and D. C. Wiley (1988). "Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid." Nature **333**(6172): 426-431.
- Wek, R. C., H. Y. Jiang and T. G. Anthony (2006). "Coping with stress: eIF2 kinases and translational control." Biochem Soc Trans **34**(Pt 1): 7-11.
- Wells, S. E., P. E. Hillner, R. D. Vale and A. B. Sachs (1998). "Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors." Mol Cell **2**(1): 135-140.
- Wigler, M., R. Sweet, G. K. Sim, B. Wold, A. Pellicer, E. Lacy, T. Maniatis, S. Silverstein and R. Axel (1979). "Transformation of mammalian cells with genes from procaryotes and eucaryotes." Cell **16**(4): 777-785.
- Wise, H. M., A. Foeglein, J. Sun, R. M. Dalton, S. Patel, W. Howard, E. C. Anderson, W. S. Barclay and P. Digard (2009). "A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA." J Virol **83**(16): 8021-8031.
- Wolstenholme, A. J., T. Barrett, S. T. Nichol and B. W. Mahy (1980). "Influenza virus-specific RNA and protein syntheses in cells infected with temperature-sensitive mutants defective in the genome segment encoding nonstructural proteins." J Virol **35**(1): 1-7.
- Wong, J. P., M. E. Christopher, A. M. Salazar, L. Q. Sun, S. Viswanathan, M. Wang, E. G. Saravolac and M. J. Cairns (2010). "Broad-spectrum and virus-specific nucleic acid-based antivirals against influenza." Front Biosci (Schol Ed) **2**: 791-800.
- Woo, H. M., K. S. Kim, J. M. Lee, H. S. Shim, S. J. Cho, W. K. Lee, H. W. Ko, Y. S. Keum, S. Y. Kim, P. Pathinayake, C. J. Kim and Y. J. Jeong (2013). "Single-stranded DNA aptamer that specifically binds to the influenza virus NS1 protein suppresses interferon antagonism." Antiviral Res **100**(2): 337-345.
- Y**
- Yamanaka, K., A. Ishihama and K. Nagata (1988). "Translational regulation of influenza virus mRNAs." Virus Genes **2**(1): 19-30.
- Yamanaka, K., A. Ishihama and K. Nagata (1990). "Reconstitution of influenza virus RNA-nucleoprotein complexes structurally resembling native viral ribonucleoprotein cores." J Biol Chem **265**(19): 11151-11155.
- Yamanaka, K., K. Nagata and A. Ishihama (1991). "Temporal control for translation of influenza virus mRNAs." Arch Virol **120**(1-2): 33-42.
- Yamayoshi, S., M. Watanabe, H. Goto and Y. Kawaoka (2015). "Identification of A Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus." J Virol.
- Yanguéz, E. and A. Nieto (2011). "So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell." Virus Res **156**(1-2): 1-12.
- Yanguéz, E., P. Rodríguez, I. Goodfellow and A. Nieto (2012). "Influenza virus polymerase confers independence of the cellular cap-binding factor eIF4E for viral mRNA translation." Virology **422**(2): 297-307.

Ye, Z. P., R. Pal, J. W. Fox and R. R. Wagner (1987). "Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus." J Virol **61**(2): 239-246.

York, A. and E. Fodor (2013). "Biogenesis, assembly, and export of viral messenger ribonucleoproteins in the influenza A virus infected cell." RNA Biol **10**(8): 1274-1282.

Young, R. J. and J. Content (1971). "5'-terminus of influenza virus RNA." Nat New Biol **230**(13): 140-142.

Yuan, P., M. Bartlam, Z. Lou, S. Chen, J. Zhou, X. He, Z. Lv, R. Ge, X. Li, T. Deng, E. Fodor, Z. Rao and Y. Liu (2009). "Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site." Nature **458**(7240): 909-913.

Yuan, S., N. Zhang, K. Singh, H. Shuai, H. Chu, J. Zhou, B. K. Chow and B. J. Zheng (2015). "Cross-protection of influenza A virus infection by a DNA aptamer targeting the PA endonuclease domain." Antimicrob Agents Chemother **59**(7): 4082-4093.

Z

Zebedee, S. L. and R. A. Lamb (1988). "Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions." J Virol **62**(8): 2762-2772.

Zhao, L., Y. Peng, K. Zhou, M. Cao, J. Wang, X. Wang, T. Jiang and T. Deng (2014). "New insights into the nonconserved noncoding region of the subtype-determinant hemagglutinin and neuraminidase segments of influenza A viruses." J Virol **88**(19): 11493-11503.

Zheng, H., P. Palese and A. Garcia-Sastre (1996). "Nonconserved nucleotides at the 3' and 5' ends of an influenza A virus RNA play an important role in viral RNA replication." Virology **217**(1): 242-251.

Zheng, M., P. Wang, W. Song, S. Y. Lau, S. Liu, X. Huang, B. W. Mok, Y. C. Liu, Y. Chen, K. Y. Yuen and H. Chen (2015). "An A14U Substitution in the 3' Noncoding Region of the M Segment of Viral RNA Supports Replication of Influenza Virus with an NS1 Deletion by Modulating Alternative Splicing of M Segment mRNAs." J Virol **89**(20): 10273-10285.

ANEXO